

Hasil Karya Akhir

**PERAN PEMBERIAN KURKUMIN TERHADAP EKSPRESI
MMP-2 DAN TIMP-2 PADA *HEPATIC STELLATE CELLS* TIKUS MODEL
FIBROSIS HATI AKIBAT INDUKSI KARBON TETRAKLORIDA**

**Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar
Dokter Spesialis Penyakit Dalam**



Oleh :

dr. Retti Nurlaili

Pembimbing :

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH

dr. Bogi Pratomo, Sp.PD-KGEH

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS PENYAKIT DALAM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RSUD dr. SAIFUL ANWAR MALANG**

2018

LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR

Peran Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 pada *Hepatic Stellate Cells* Tikus Model
Fibrosis Hati Akibat Induksi Karbon Tetraklorida

Diajukan Guna Melengkapi Tugas-tugas dan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam

Oleh:

dr. Reti Nurlaili

NIM: 138070200011007

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Supriono Sp.PD-KGEH

19660517 199803 1 004

dr. Bogi Pratomo W. Sp.PD-KGEH

19700127 1998031008

Mengetahui,

KPS PPDS-1 Ilmu Penyakit Dalam

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

RSUD dr. Saiful Anwar Malang

dr. Putu Moda Arsana, SpPD-KEMD, FINASIM

NIP. 19560503 198403 1 008

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam karya akhir ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia karya akhir ini digugurkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 1 Mei 2018

Penulis,

Nama : Retti Nurlaili
NIM : 138070200011007
PS : Ilmu Kedokteran
Prog. : PPDS-1
Fak. : Kedokteran UB

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur senantiasa kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga karya akhir dengan judul “Peran Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 pada *Hepatic Stellate Cells* Tikus Model Fibrosis Hati Akibat Induksi Karbon Tetraklorida” ini dapat terselesaikan.

Ucapan terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada semua pihak yang telah berjasa dalam menyelesaikan penelitian ini, terutama kepada:

1. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
2. Direktur RSUD dr. Saiful Anwar, Malang
3. dr. Budi D. Machsoos, SpPD-KHOM, FINASIM selaku Kepala Departemen/SMF Ilmu Penyakit Dalam
4. dr. Putu Moda Arsana, SpPD-KEMD, FINASIM selaku Ketua Program Studi dan dr. Djoko Heri Hermanto, SpPD-KHOM, FINASIM selaku Sekretaris Program Studi PPDS-1 Ilmu Penyakit Dalam.
5. dr. Supriono, SpPD-KGEH dan dr. Bogi Pratomo W. SpPD-KGEH selaku pembimbing penelitian yang senantiasa mengarahkan, memotivasi dan memberikan jalan keluar untuk segala permasalahan yang muncul dalam proses pengerjaan penelitian ini.
6. Prof. DR. dr. Handono Kalim, SpPD-KR, Prof. DR. dr. Djanggan Sargowo, SpPD, SpJP, Prof. DR. dr. Harijono Achmad, SpPD-KGEH, Prof. dr. Djoko Wahono Soeatmadji, SpPD-KEMD, Prof. DR. dr. A. Rudijanto, SpPD-KGH, dr. Nursamasu SpPD-KGH, dr. B.P. Putra Suryana, SpPD-KR, dr. C. Singgih Wahono, SpPD-KR, dr. Supriono, SpPD-KGEH, dr. Bogi Pratomo, SpPD-KGEH, dr. Gatoet Ismanoe, SpPD-KPTI, dr. Niniek Budiarti, SpPD-KPTI, dr.

Sri Sunarti Sp.PD-KGer, dr. Laksmi Sasiarini, SpPD-KEMD, dr. Didi Candradikusma, SpPD-KPTI, dr. Shinta Oktya Wardani, SpPD, dr. Gadis Nurlaela Mattaliti, SpPD, dr. Rulli Rosandi, SpPD, dr. Syifa Mustika, SpPD, dr. Dewi Indiasari, SpPD, dr. Heri Sutanto, SpPD dan dr. Herwindo, Sp.PD atas segala saran, teladan, dukungan, serta ajaran Beliau semua yang dapat menjadi motivasi selama menjalani PPDS.

7. Mbak Sari, Mbak Aini, Bu Ketut, Mbak Thia, Mbak Winda, Mbak Heni, Mbak Eme, Mbak Desi, Mbak Datik, Mbak Riska, Mbak Nana dan karyawan administrasi lainnya, selaku pegawai di lingkungan SMF IPD RSSA yang telah membantu semua proses dalam penulisan karya akhir ini.
8. Orang tua tercinta Bapak Musbandi dan Ibunda (almh) Dewi Sa'adah, Kakak-Kakak terkasih yang selalu memberikan semangat, restu dan doa yang tiada henti.
9. Suami saya Chairul Maulidi dan Ananda tercinta Athar Al Thariq yang selalu memberikan dukungan dan semangat saya untuk segera menyelesaikan pendidikan spesialis ini, serta kesabaran, pengertian, dan pengorbanannya yang tidak akan tergantikan.
10. Ibu mertua Siti Rodijah atas doa, keikhlasan, cinta kasih, dukungan moral yang tiada putus-putusnya.
11. Teman-teman seperjuangan angkatan 35, dr. Fernando Hasudungan Sp.PD, dr. Nina Nurarifah Sp.PD, dr. Lia Sasmithae Sp.PD, dr. Rakhmad Ramadhan, dr. Nugraha Setiawan, dan dr. Eka Maya yang senantiasa mendukung, bahu membahu, saling mengisi dan memotivasi sebagai satu tim yang solid serta seperti saudara sendiri.

12. Tim penelitian saya, dr. Asri Nugraheni Sp.PD, dr. Nor Hedayanti Sp.PD, dr. Muhammad Kriestian, dr. Vina Tri Aditya, dr. Eka Maya Sofa Irawati, dr. Deddy Indra Praja, dr. Helena, dan dr. Kathy S. Kancana serta mahasiswa penelitian S1, Iqbal, Indra, Abduh, Ayu Novita, Ian, Ikhsan, Lazuardi, Loisa Holly, Yoga yang telah bahu membahu dalam penyelesaian penelitian ini.
13. Seluruh rekan-rekan PPDS, dokter muda, perawat, farmasi, ahli gizi, dan seluruh karyawan RSSA/FKUB yang telah membantu saya menjalankan tugas sebagai residen selama ini.
14. Semua pihak yang telah turut andil demi tersusunnya tugas akhir ini yang tidak dapat peneliti ungkapkan satu persatu.

Penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu kedokteran dan kepentingan masyarakat. Penulis menyadari bahwa penelitian ini jauh dari kata sempurna, untuk itu penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya dan berharap selanjutnya dilakukan penelitian dengan metode yang lebih baik.

Malang, Mei 2018

Retti Nurlaili

ABSTRAK

Nurlaili, R., Supriono, Pratomo B. 2018. Peran Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 pada *Hepatic Stellate Cells* Tikus Model Fibrosis Hati Akibat Induksi Karbon Tetraklorida. Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Latar Belakang: Fibrosis hati merupakan hasil proses fibrogenesis dan fibrolisis. Pada proses fibrogenesis, HSCs memproduksi MMP-2 dan TIMP-2. Keduanya berfungsi mengatur homeostasis matriks ekstraseluler. Kurkumin meningkatkan ekspresi MMP-2, menurunkan ekspresi TIMP-2 serta mendorong apoptosis HSCs, yang dengannya fibrogenesis menjadi terhambat. Peran kurkumin, ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 terhadap HSCs dalam proses fibrolisis belum banyak diteliti. **Tujuan:** Mengetahui hubungan pemberian kurkumin terhadap peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs tikus model fibrosis hati. **Metode:** Penelitian ini menerapkan metode eksperimental pada tikus jantan strain wistar. Terdapat 8 kelompok tikus yakni KN, KP2, KP5, KP9, dan KK2, KK5, KK9. Masing-masing terdiri dari 4 tikus sampel. KP dipapar CCl₄ 1cc/kgbb 2x perminggu intraperitoneal selama 9 minggu membentuk fibrosis F3. KN diinjeksi Normal Salin. Setelah diinjeksi CCl₄, Kelompok Kontrol (KK2, KK5, KK9) diberikan plasebo dan Kelompok Perlakuan (KP2, KP5, KP9) diberikan kurkumin. Analisis ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 menggunakan uji t independen, ANOVA dan korelasi. **Hasil:** Terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 pada KK9 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada KK5 dan KK9; peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada KP2, KP5, dan KP9. **Kesimpulan:** Peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 dan penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 pada tikus yang diberikan kurkumin selama 2 minggu, 5 minggu dan 9 minggu. Lama pemberian kurkumin berkorelasi dengan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada tikus model fibrosis hati.

Kata kunci : Karbon tetraklorida, kurkumin, ekspresi MMP-2, ekspresi TIMP-2, HSCs, tikus model fibrosis hati

ABSTRACT

Nurlaili R., Supriono, Pratomo B. 2018. Effects of Curcumin against MMP-2 Expression and TIMP-2 Expression in *Hepatic Stellate Cells* on Rat Model *Carbon Tetrachloride* Induced Liver Fibrosis. Internal Medicine Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University.

Background: Liver fibrosis result of fibrogenesis and fibrolysis. In fibrogenesis, MMP-2 and TIMP-2 produced by HSCs, regulate ECM homeostatic. Curcumin inhibit MMP-2, TIMP-2 expression and enhance HSCs apoptosis, which is inhibit fibrogenesis. Role of curcumin, MMP-2 expression, and TIMP-2 expression in a fibrolysis has not been widely studied. **Objective:** Determine correlation between giving of curcumin to increase MMP-2 expression and decreased TIMP-2 expression rat model of liver fibrosis. **Methods:** Experimental study in male rats wistar strain. There are 8 groups KN, KP2, KP5, KP9, dan KK2, KK5, KK9; 4 rats for each. KP group was exposed to CCl₄ 1cc/kg intraperitoneally 2 times per week for 9 weeks to form F3 fibrosis. KN group was injected Normal saline. After CCl₄ injected, Control group (KK) was given placebo and intervention group (KP) was given curcumin. Analysis of MMP-2 and TIMP-2 expression at HSCs is conducted by independent t-test, ANOVA and correlation test. **Result:** Increase MMP-2 expression in KK9 and decrease TIMP-2 expression in KK5 and KK9. Increase MMP-2 expression and decrease TIMP-2 expression in KP2, KP5, and KP9. **Conclusion:** Remarkable increase MMP-2 and remarkable decrease TIMP-2 expression in HSCs after giving of curcumin 2, 5 and 9 weeks. Duration curcumin correlated with increase MMP-2 expression and decrease TIMP-2 expression in rat model liver fibrosis.

Keywords: *Carbon tetrachloride*, curcumin, MMP-2 expression, TIMP-2 expression, HSCs, rat model liver fibrosis

ABSTRAK

Nurlaili, R., Supriono, Pratomo B. 2018. Peran Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 pada *Hepatic Stellate Cells* Tikus Model Fibrosis Hati Akibat Induksi Karbon Tetraklorida. Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Latar Belakang: Fibrosis hati merupakan hasil proses fibrogenesis dan fibrolisis. Pada proses fibrogenesis, HSCs memproduksi MMP-2 dan TIMP-2. Keduanya berfungsi mengatur homeostasis matriks ekstraseluler. Kurkumin meningkatkan ekspresi MMP-2, menurunkan ekspresi TIMP-2 serta mendorong apoptosis HSCs, yang dengannya fibrogenesis menjadi terhambat. Peran kurkumin, ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 terhadap HSCs dalam proses fibrolisis belum banyak diteliti. **Tujuan:** Mengetahui hubungan pemberian kurkumin terhadap peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs tikus model fibrosis hati. **Metode:** Penelitian ini menerapkan metode eksperimental pada tikus jantan strain wistar. Terdapat 8 kelompok tikus yakni KN, KP2, KP5, KP9, dan KK2, KK5, KK9. Masing-masing terdiri dari 4 tikus sampel. KP dipapar CCl₄ 1cc/kgbb 2x perminggu intraperitoneal selama 9 minggu membentuk fibrosis F3. KN diinjeksi Normal Salin. Setelah diinjeksi CCl₄, Kelompok Kontrol (KK2, KK5, KK9) diberikan plasebo dan Kelompok Perlakuan (KP2, KP5, KP9) diberikan kurkumin. Analisis ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 menggunakan uji t independen, ANOVA dan korelasi. **Hasil:** Terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 pada KK9 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada KK5 dan KK9; peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada KP2, KP5, dan KP9. **Kesimpulan:** Peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 dan penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 pada tikus yang diberikan kurkumin selama 2 minggu, 5 minggu dan 9 minggu. Lama pemberian kurkumin berkorelasi dengan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 pada tikus model fibrosis hati.

Kata kunci : Karbon tetraklorida, kurkumin, ekspresi MMP-2, ekspresi TIMP-2, HSCs, tikus model fibrosis hati

ABSTRACT

Nurlaili R., Supriono, Pratomo B. 2018. Effects of Curcumin against MMP-2 Expression and TIMP-2 Expression in *Hepatic Stellate Cells* on Rat Model *Carbon Tetrachloride* Induced Liver Fibrosis. Internal Medicine Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University.

Background: Liver fibrosis result of fibrogenesis and fibrolysis. In fibrogenesis, MMP-2 and TIMP-2 produced by HSCs, regulate ECM homeostatic. Curcumin inhibit MMP-2, TIMP-2 expression and enhance HSCs apoptosis, which is inhibit fibrogenesis. Role of curcumin, MMP-2 expression, and TIMP-2 expression in a fibrolysis has not been widely studied. **Objective:** Determine correlation between giving of curcumin to increase MMP-2 expression and decreased TIMP-2 expression rat model of liver fibrosis. **Methods:** Experimental study in male rats wistar strain. There are 8 groups KN, KP2, KP5, KP9, dan KK2, KK5, KK9; 4 rats for each. KP group was exposed to CCl₄ 1cc/kg intraperitoneally 2 times per week for 9 weeks to form F3 fibrosis. KN group was injected Normal saline. After CCl₄ injected, Control group (KK) was given placebo and intervention group (KP) was given curcumin. Analysis of MMP-2 and TIMP-2 expression at HSCs is conducted by independent t-test, ANOVA and correlation test. **Result:** Increase MMP-2 expression in KK9 and decrease TIMP-2 expression in KK5 and KK9. Increase MMP-2 expression and decrease TIMP-2 expression in KP2, KP5, and KP9. **Conclusion:** Remarkable increase MMP-2 and remarkable decrease TIMP-2 expression in HSCs after giving of curcumin 2, 5 and 9 weeks. Duration curcumin correlated with increase MMP-2 expression and decrease TIMP-2 expression in rat model liver fibrosis.

Keywords: *Carbon tetrachloride*, curcumin, MMP-2 expression, TIMP-2 expression, HSCs, rat model liver fibrosis

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Di jaringan hati normal dan saat terjadi injuri hati akut terjadi keseimbangan antara sintesis dan degradasi *extra cellular matrix* (ECM). Saat terjadi injuri hati kronis, terjadi inflamasi berkepanjangan yang mengganggu keseimbangan tersebut sehingga terjadi penumpukan ECM dan terbentuk fibrosis hati dimana salah satu agen penyebab fibrosis hati adalah karbon tetraklorida.^{1,2}

Fibrosis hati, awalnya dianggap sebagai kondisi ireversibel, namun berdasarkan patogenesis fibrosis hati menunjukkan bahwa fibrosis hati merupakan keadaan yang reversibel. Fibrosis hati merupakan hasil dari proses fibrogenesis dan fibrolisis, dan menggambarkan suatu kondisi penyakit hati kronis. Saat ini semakin jelas bahwa fibrosis hati merupakan proses yang sangat dinamis, dimana dogma lama bahwa fibrosis hati merupakan proses yang ireversibel mulai mendapat tantangan.³ Resolusi fibrosis hati dapat terjadi secara spontan maupun melalui proses apoptosis *Hepatic Stellate Cells* (HSCs), reversi HSCs dan perubahan *aHSCs* (*Activated HSC*) menjadi *qHSCs* (*Quiescent HSC*).⁴ Salah satu yang bertanggung jawab proses resolusi fibrosis hati secara spontan adalah hilangnya etiologi serta adanya apoptosis HSCs dan perubahan degradasi matrik ekstraselular menuju ke arah perbaikan histologi jaringan hati.^{5,6} Resolusi fibrosis hati melibatkan *remodelling* dan pemecahan beberapa komponen ECM, terutama degradasi kolagen tipe I dan kolagen tipe IV, salah satu komponen utama dari ECM.⁷

Sumber utama ECM hati berasal dari HSCs yang teraktivasi, oleh karena HSCs diduga paling bertanggung jawab dalam menjaga homeostasis matrik ekstraselular hati. Pada saat injuri hati, HSC-pasif (*Quiescent HSC, qHSC*) mengalami diferensiasi menjadi HSC aktif/miofibroblas (*myofibroblast-like cells, activated HSCs, aHSC*). *aHSC* mempunyai tingkat proliferasi tinggi untuk membentuk matrik ekstraselular dan berakhir menjadi fibrosis hati. Di jaringan hati yang normal tidak ditemukan miofibroblas, tetapi pada saat terjadi injuri hati mereka tertumpuk di daerah injuri.⁸

Jaringan hati mempunyai kemampuan luar biasa dalam memperbaiki dan meregenerasi diri pasca injuri. Perbaikan dan regenerasi tersebut dikaitkan dengan jalur-jalur yang terkait dengan kompleks matrik ekstraseluler. Degradasi normal komponen matrik ekstraseluler merupakan tanda penting dari proses perbaikan dan remodeling jaringan hati. Enzim yang paling utama terlibat dalam degradasi ECM adalah *Matrix Metalloproteinases* (MMP).⁹ MMP bekerja sama dengan penghambatnya, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP), menjaga homeostasis matrik ekstraseluler hati. Adanya inflamasi kronis menyebabkan akumulasi berlebih komponen matrik ekstraseluler, seperti fibronektin, kolagen dan proteoglikan, yang memberikan peran penting dalam terbentuknya jaringan parut.^{9,10}

Pada proses resolusi fibrosis hati terjadi degradasi ECM dimana salah satu MMP yang berperan penting adalah MMP-2. Meskipun peran MMP-2 belum banyak dibahas dalam literature, namun diduga MMP-2 mempunyai sifat anti-fibrotik dengan mempengaruhi derajat deposisi kolagen hati selama aktivasi HSCs.¹¹ Satu penelitian melaporkan bahwa peningkatan MMP-2 selama proses fibrosis hati diduga merupakan mekanisme penting dalam menghambat *aHSC*

untuk mensintesis kolagen tipe I.⁷ MMP-2 memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan MMP yang lain dalam fibrosis hati, yaitu kemampuan dalam mendegradasi dua tipe kolagen terbesar yang bertanggung jawab terhadap proses fibrosis hati (Kolagen tipe I, III dan IV).^{12,13} MMP-2 mendegradasi ECM dengan enzim proteolitik dengan memfasilitasi migrasi leukosit. MMP-2 juga menyebabkan pelepasan sel parenkim dari ECM sehingga terjadi apoptosis melalui “anoikis”.¹⁴ MMP-2 menginduksi apoptosis aHSC melalui peningkatan pemecahan N-cadherin yang menghambat pelepasan *Bcl-xl* (*B cell lymphoma-extra large*, suatu gen anti apoptosis) dan sekaligus mengaktifkan pelepasan *Bax* (*Bcl2-associated X protein*, suatu gen pro apoptosis).^{15,16}

Beberapa penelitian berfokus pada HSCs sebagai sumber utama fibrogenesis pada kerusakan hati (>80%). Sel tersebut memproduksi komponen ECM dalam jumlah besar dan juga meregulasi pemecahan ECM. Ternyata selain HSCs, miofibroblas juga diproduksi oleh BMF (*bone marrow fibroblast*) (10-15%) dan sisanya oleh EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*).^{17,18} MMP-2 memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas *bone marrow fibroblast* dan EMT, mendegradasi ECM dan menginduksi apoptosis miofibroblas yang dihasilkan keduanya melalui hambatan terhadap SDF-1 (*Stromal Cell Derived Factor-1*) sehingga terjadi hambatan proliferasi dan migrasi dari EMT dan BMF.^{17,19,20} Ekspresi MMP-2 terdeteksi sebagian besar pada HSCs dan sebagian kecil pada sel endothelial, sedangkan pada sel Kupffer ekspresinya tidak mengalami perubahan.²¹ Ekspresi MMP-2 meningkat 7-12 kali pada HSCs yang mengalami fibrosis.²²

Peran TIMP-2 dalam proses fibrogenesis hati sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. TIMP-2 diduga mempunyai efek pro-fibrotik karena dapat

menginduksi injuri, memiliki efek anti apoptosis, mengaktivasi miofibroblas, menghambat secara kuat aktivitas MMP-2 dan pro-MMP-2.²³ TIMP-2 lebih spesifik sebagai marker pada fibrosis hati dibandingkan TIMP-1 yang dapat meningkat pada keadaan fibrosis di tempat lain seperti di paru-paru, ginjal dan pankreas.²⁴ Ekspresi TIMP-2 meningkat 5-7 kali pada HSCs yang mengalami fibrosis.¹⁰ MMP-2 sebagai anti-fibrotik dan TIMP-2 sebagai pro-fibrotik bekerja sinergis untuk menjaga keseimbangan ketika terjadi inflamasi hati atau pada proses penyembuhan fibrosis hati.¹

Kurkumin, suatu polifenol, merupakan senyawa aktif utama berasal dari tanaman *Curcuma longa*. Kurkumin mempunyai efek antioksidan dan anti-inflamasi dan dipakai sebagai obat herbal selama ratusan tahun. Kurkumin juga mempunyai efek anti-fibrotik karena dapat menghambat proliferasi HSCs dan aktivasi HSC melalui penghambatan HIF-1 α dari jalur *ERK-dependent*.²⁵

Pengaruh langsung kurkumin terhadap MMP-2 pada fibrosis hati belum banyak dibahas di literatur. Penelitian *in vivo* lain juga memperlihatkan kurkumin dalam meningkatkan ekspresi MMP-2 pada proses fibrosis hati.²⁶ Pemberian kurkumin juga menunjukkan penurunan ekspresi TIMP-2 pada tikus model fibrosis hati.²⁷ Kurkumin menghambat aktivasi protein Ras (suatu protein yang mengatur proliferasi sel) sehingga akan meningkatkan ekspresi MMP-2 dan menghambat ekspresi TIMP-2 yang selanjutnya akan menghambat jalur *PI3/Akt* dan terjadi hambatan terhadap pelepasan *Bcl-xl* dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* sehingga terjadi apoptosis aHSC.²⁸⁻³⁰

Dengan hilangnya etiologi, diharapkan dapat terjadi perbaikan fibrosis hati, bahkan dapat menyebabkan terjadinya resolusi spontan.⁵ Dengan penambahan kurkumin sebagai antifibrosis, diharapkan dapat mempercepat resolusi fibrosis

hati. Di atas telah dijelaskan bahwa MMP-2 dan TIMP-2 memiliki peran penting dalam proses resolusi fibrosis hati, akan tetapi masih belum banyak penelitian mengenai peran MMP-2 dan TIMP-2 pada resolusi fibrosis hati.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati?
2. Apakah terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada resolusi spontan dan resolusi yang diinduksi kurkumin pada fibrosis hati?
3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs antara kelompok yang diberi dan tanpa diberi kurkumin pada fibrosis hati?
4. Apakah terdapat hubungan antara lama pemberian kurkumin dengan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui peran kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur rerata ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati.

2. Mengukur rerata ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada resolusi spontan dan resolusi yang diinduksi kurkumin pada fibrosis hati.
3. Mengukur perbandingan rerata ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kelompok yang diberi dan tanpa diberi kurkumin pada fibrosis hati.
4. Mengukur hubungan lama pemberian kurkumin dengan perubahan rerata ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Klinis

1. Membuktikan bahwa kurkumin sebagai obat herbal yang dapat digunakan sebagai terapi anti fibrosis hati.
2. Mengetahui lama pemberian kurkumin terhadap perbaikan fibrosis hati.

1.4.2 Manfaat Akademis

1. Mengetahui peran MMP-2 dan TIMP-2 dalam resolusi fibrosis hati.
2. Mengetahui peran kurkumin pada resolusi fibrosis hati.
3. Sebagai kajian untuk penelitian lebih lanjut.

BAB 2

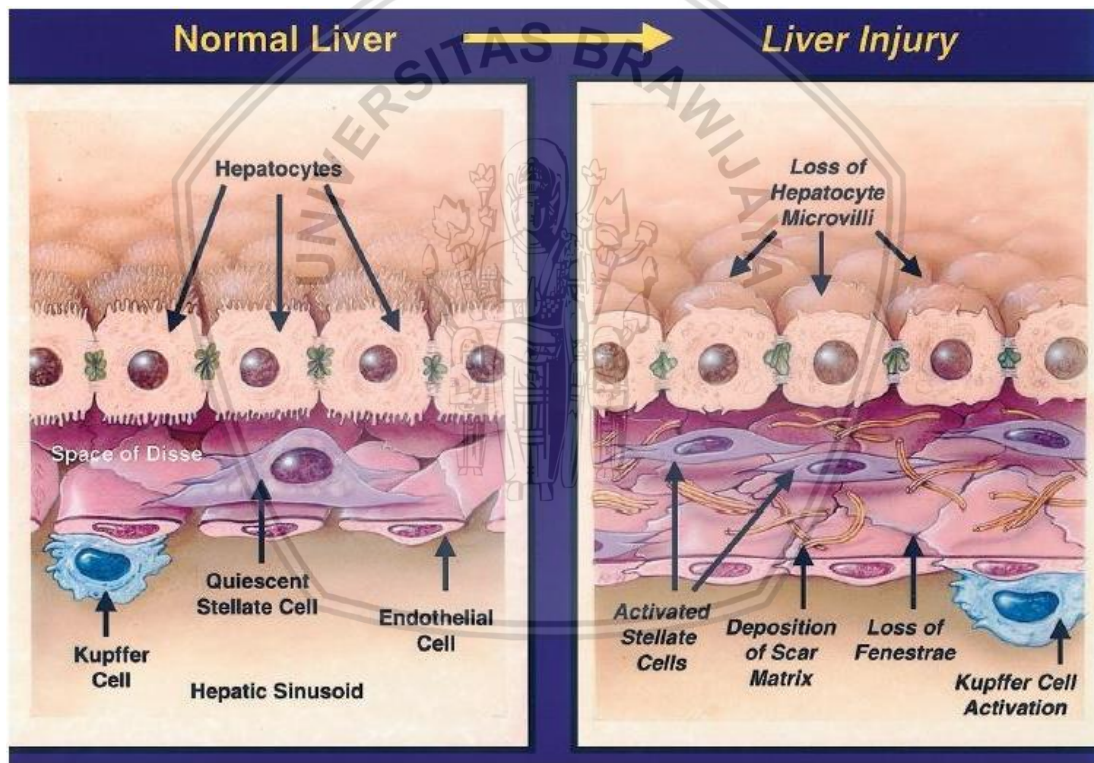
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah proses patofisiologi yang terjadi akibat injuri kronis hati, yang mempresentasikan mekanisme dasar pertahanan alami pada hati dan merupakan komplikasi klinis pada hampir seluruh penyakit hati kronik. Fibrosis hati ditandai dengan aktivasi selular dari sel stellata hati (HSCs) dan mediatornya. Saat terjadi injuri di hati, HSCs berubah menjadi aktif menjadi *myofibroblast-like cell* yang berkontraksi, berproliferasi, dan bersifat fibrogenik. Pada saat yang bersamaan, terjadi pembentukan kolagen dan matriks ekstra selular secara berlebihan yang mengakibatkan terbentuknya jaringan sikatrik pada parenkim hati. Aktivasi HSCs terjadi melalui dua fase utama, yaitu fase inisiasi (fase pre-inflamasi) dan fase persuasi yang akan diikuti dengan fase resolusi apabila injuri segera ditangani. Fibrosis hati merupakan proses dinamis dan reversibel yang merupakan hasil keseimbangan dari fibrogenesis dan kerusakan dari degradasi matriks yang dihasilkan.³¹

Fibrosis bersifat reversibel jika penyebab kerusakan hati dapat diatasi, berlawanan dengan fibrosis, pada sirosis menunjukkan proses yang irreversibel. Namun dari data penelitian pada hewan dan manusia dengan sirosis yang disebabkan oleh virus hepatitis B dan C menunjukkan sirosis dapat reversibel bila penyebab terjadinya kerusakan hati kronis dapat teratasi. Manifestasi sirosis tahap lanjut pada hewan coba menunjukkan bahwa sirosis menjadi ireversibel bila terdapat kolagen

yang *cross-linking* dengan transglutaminase jaringan sehingga terbentuk matriks insoluble dengan jaringan parut yang relatif resisten terhadap degradasi. Faktor tambahan yang mempengaruhi reversibilitas sirosis adalah banyaknya kolagen yang terbentuk dan menyatu dengan *broad fibrating band* yang tidak dapat didegradasi oleh enzim, durasi sirosis yang mencerminkan periode pembentukan kolagen, hal tersebut menyebabkan berkurangnya ekspresi *matrix-degrading enzyme* ataupun peningkatan ekspresi protein yang menghambat fungsi *matrix-degrading enzyme*.^{32,33}



Gambar 2.1 Skematik Perubahan Jaringan Hati saat Fibrosis.³⁴

2.2. Patofisiologi Fibrosis Hati

Fibrosis hati merupakan hasil respon penyembuhan luka dari hati. Setelah kerusakan akut pada hati, sel parenkim hati beregenerasi dan menggantikan sel yang

nekrosis atau sel yang mengalami apoptosis. Proses ini berhubungan dengan respon inflamasi dan deposisi dari *extra cellular matrix* (ECM). Jika kerusakan liver terjadi terus-menerus dan regenerasi sel hati gagal, hepatosit akan digantikan oleh ECM. ECM merupakan makromolekul yang terdiri dari kolagen, glikoprotein dan proteoglikan. Beberapa kolagen dapat berkembang cepat, diantaranya kolagen XVIII, yang merupakan prekursor molekul angiotensin. Glikoprotein terdiri dari *fibronectin*, *laminin*, *merosin*, *tenascin*, *nidogen*, dan *hyaluronic acid*. Proteoglikan terdiri dari heparin, dermatan sulfate, chondroitin sulfate, *perlecan dystroglycan*, *biglycan*, dan *decorin*. Distribusi dari jaringan fibrosis tergantung dari asal kerusakan hati. Pada infeksi virus hepatitis kronis dan kelainan kolestasis kronis, jaringan fibrosis awalnya terletak disekitar saluran portal, sementara pada alkohol yang menginduksi kerusakan hati, jaringan fibrosis terletak di perisentral dan are perisinusoidal.^{32,35}

Di jaringan hati normal, subendotelial Dissee's space memisahkan antara epitel (hepatosit) dengan sinusoidal. Ruang ini berisi basement *membrane-like matrix*, dimana membrane basemen ini terdiri dari *non-fibril-forming-collagen*, termasuk diantaranya tipe IV, VI, XIV, glikoprotein dan proteoglikan.³²

Ketika terjadi kerusakan hati, perubahan akan segera terjadi pada sinusoid hati. Perubahan ini disebut sebagai *capillarization of sinusoids*. Selama proses ini akan terjadi pengurangan jumlah dan ukuran pori-pori pada sel endotelial dari sinusoid, perkembangan dari right basal membrane dan akumulasi komponen ECM di *subendothelial Dissee's space*, yang disebut fibrosis perisinusoidal. Di bawah sel endotelial, matriks protein akan meningkat, termasuk komponen dari basal membrane, kolagen tipe IV, fibronectin dan laminin. Komponen-komponen ECM ini

terorganisasi pada suatu struktur di basal membrane. Kolagen tipe I, III, IV dan VI, tenascin dan undulin juga terakumulasi di *Disse's space*.^{32,35}

Peningkatan akumulasi jaringan fibrosis di Disse's space, merupakan hal yang tidak menguntungkan. Hal tersebut menyebabkan berkurangnya pasokan oksigen dan nutrisi pada hepatosit, yang menimbulkan nekrosis hepatosit dan meningkatkan proses fibrosis itu sendiri dan kapilarisasi dari sinusoid menjadi penyebab utama penurunan fungsi hati dalam perkembangan fibrosis hati menjadi sirosis. Deposisi kolagen pada Disse's space menimbulkan penyempitan lumen hati dan meningkatkan resistensi pembuluh darah di dalam hati yang berkontribusi dalam perkembangan hipertensi portal.³⁶

Fibrosis hati berhubungan dengan perubahan pada kuantitas dan komposisi ECM. Akumulasi ECM menghasilkan peningkatan sintesis dan berkurangnya degradasi ECM. Berkurangnya aktivitas MMPs disebabkan karena ekspresi yang berlebihan inhibitor spesifik yaitu TIMPs. HSCs merupakan sel yang memproduksi ECM pada kerusakan hati. Pada hati normal, HSCs terletak di Disse's space dan tempat penyimpanan utama vitamin A. akibat adanya kerusakan liver yang lama, HSCs teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi myofibroblast-like cells, bersifat kontraktil, proinflamasi dan fibrogenik.³⁵

HSCs yang teraktivasi bermigrasi dan terakumulasi pada jaringan yang mengalami perbaikan, mengeluarkan cukup banyak ECM dan meregulasi degradasi ECM. PDGF diproduksi oleh sel Kupffer, merupakan nitrogen yang dominan untuk aktivasi HSCs. Hepatosit yang rusak mengeluarkan *reactive oxygen species* (ROS) dan mediator fibrogenik yang menginduksi penarikan sel darah putih oleh sel-sel

inflamasi. ROS juga memicu pengeluaran Angiotensin II yang juga menstimulasi aktivasi HSCs dan deposisi ECM.³⁷ Ikatan Angiotensin II dengan reseptor Angiotensin tipe 1 menyebabkan fosforilasi smad2 dan smad3 melalui jalur ERK/p38/MAPK. Komplek smad2 dan smad3 yang teraktivasi bergabung dengan smad4 dan mengalami translokasi ke dalam nucleus menghasilkan transkripsi pada target organ termasuk TGF B1, prokolagen I, prokolagen III dan fibronektin. Ikatan AngII-AT1 dapat secara langsung mengaktivasi TGF B1.³⁸ Angiotensin II juga menginduksi miofibroblas sehingga memacu kerja MMP-2 untuk mendegradasi ECM pada fibrosis hati, terutama kolagen tipe I, III dan IV.³⁹ Angiotensin II memiliki kemampuan menghambat kerja MMP-2 dan meningkatkan kerja TIMP-2 melalui peningkatan aktivitas PAI (*Plasminogen Activator Inhibitor*) sehingga terjadi hambatan plasmin dalam mengaktivasi MMP-2.⁴⁰

2.2.1. Aktivasi HSCs

Sebagai akibat dari berbagai kerusakan hati, HSCs mengalami suatu proses yang disebut dengan aktivasi yang ditandai dengan sel quiescent yang kaya akan vitamin A menjadi sel yang proliferative, fibrogenik dan menjadi miofibroblast kontraktile. *qHSCs* juga mengaktivasi sekresi *PPAR γ* yang merupakan agen anti fibrotik.⁴³ Aktivasi *PPAR γ* akan mencegah ikatan antara protein p-300 dengan protein Smad yang menyebabkan penurunan produksi TGF- β 1 dan menurunkan kejadian fibrosis hati.³⁹ *PPAR γ* juga memiliki kemampuan memacu kerja MMP-2 dan menghambat TIMP-2 melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen Activator Inhibitor*) sehingga plasmin akan mengaktivasi MMP-2 untuk mendegradasi ECM.^{40,44} Dengan adanya aktivasi *aHSCs* akan mengurangi sekresi *PPAR γ* oleh *qHSCs*.

Aktivasi HSCs terdiri dari tiga fase yaitu fase inisiasi, fase pengeklaman (*perpetuation phase*) dan fase resolusi.⁴⁵

2.2.1.1. Jalur Inisiasi

Oxidative stress merupakan faktor aktivasi HSCs. Akibat dari kerusakan sel endotel hati menyebabkan produksi fibronektin selular yang dapat menstimulasi aktivasi HSCs. Adanya apoptosis sel hati juga diduga memicu timbulnya respon terhadap HSCs. Platelet yang didapatkan pada hati yang mengalami kerusakan merupakan sumber stimulus parakrin yang mengakibatkan pelepasan beberapa mediator, diantaranya PDGF, TGF- β dan *epidermal growth factor* (EGF).⁴⁶

Pada awal aktivasi HSCs terjadi perubahan yang progresif di sekitar ECM dalam *subendotelial space of Disse*. Dengan berjalannya waktu, terjadi perubahan komposisi *matrix subendotelial* dari kolagen tipe IV, *heparin sulfate*, *proteoglycan* dan laminin menjadi kolagen yang kaya fibril, khususnya kolagen tipe I dan III. Salah satu perubahan yang penting adalah deposisi fibronectin selular dari sinusoidal endotelial cells yang memiliki efek terhadap aktivasi HSCs. Karena respon ini tergantung terhadap TGF- β 1, induksi dari sitokin ini harus muncul terlebih dahulu, begitu juga sumber autokrin dan parakrin.⁴⁷

Perubahan pada komposisi ECM pada akumulasi fibrosis memberikan beberapa feedback positif yang nantinya akan mengamplifikasi fibrosis. Pertama, terjadi perubahan dinamik pada reseptor membrane yang memprovokasi aktivasi dan migrasi dari HSCs. Kedua, aktivasi *matrix metalloproteinases* selular menimbulkan pengeluaran dari *growth factor* yang akan menstimulasi *cellular growth* dan

fibrogenesis. Ketiga, peningkatan densitas dari ECM menyebabkan kekakuan dari matriks yang akan menjadi stimulus yang signifikan terhadap aktivasi HSCs.^{40,48}

2.2.1.2. Jalur Pengekalan (*Perpetuating*)

HSCs diaktivasi oleh inisiasi stimulus yang kemudian diawali respon dari host terhadap sitokin dan *growth factor*. Sinyal ini menstimulasi terbentuknya jaringan parut melalui peningkatan proliferasi, kontraktilitas, fibrogenesis, degradasi matriks dan sinyal proinflamasi. Pada proses proliferasi, sinyal autokrin oleh PDGF merupakan sitokin utama selama aktivasi HSCs. HSCs bermigrasi ke tempat terjadinya kerusakan di hati diinduksi oleh kemoatraktan termasuk diantaranya PDGF, MCP-1 dan ligand CXCR3. Kontraktilitas HSCs berkontribusi terhadap peningkatan resistensi portal selama fibrosis hati yang diduga bersifat reversible sebelum terjadinya penebalan dari septa, intrahepatic shunt, kerusakan lobular dari perkembangan sirosis, menyebabkan peningkatan portal. bahkan pada tahap awal fibrosis, aktivasi HSCs telah menunjukkan gambaran seperti smooth muscle-like cells, yang digambarkan dengan filament kontraktil termasuk α -smooth muscle actin (α -SMA) dan myosin, yang membangkitkan kalsium dependen dan kalsium independen kekuatan kontraktil yang berkontribusi terhadap kontraktilitas selular.^{39,44}

HSCs dikenal sebagai *pericytes* spesifik dari yang berkontribusi terhadap angiogenesis di dalam perkembangan hati, regenerasi dan respon terhadap kerusakan hati. Ketika fibrosis terus berkembang, *band collagen* yang merupakan tanda dari sirosis tahap akhir berisi sejumlah besar HSCs yang teraktivasi. Sel-sel ini secara progresif mengimpedasi aliran darah portal dengan kontriksi sinusoid dan dengan mengkontraksikan sel liver yang mengalami sirosis. Pada waktu yang

bersamaan, densitas HSCs dan lumen sinusoidal yang menutup menjadi bertambah. Endothelin-1 dan NO merupakan kunci kontra regulator yang mengontrol kontraktilitas HSCs.^{44,49}

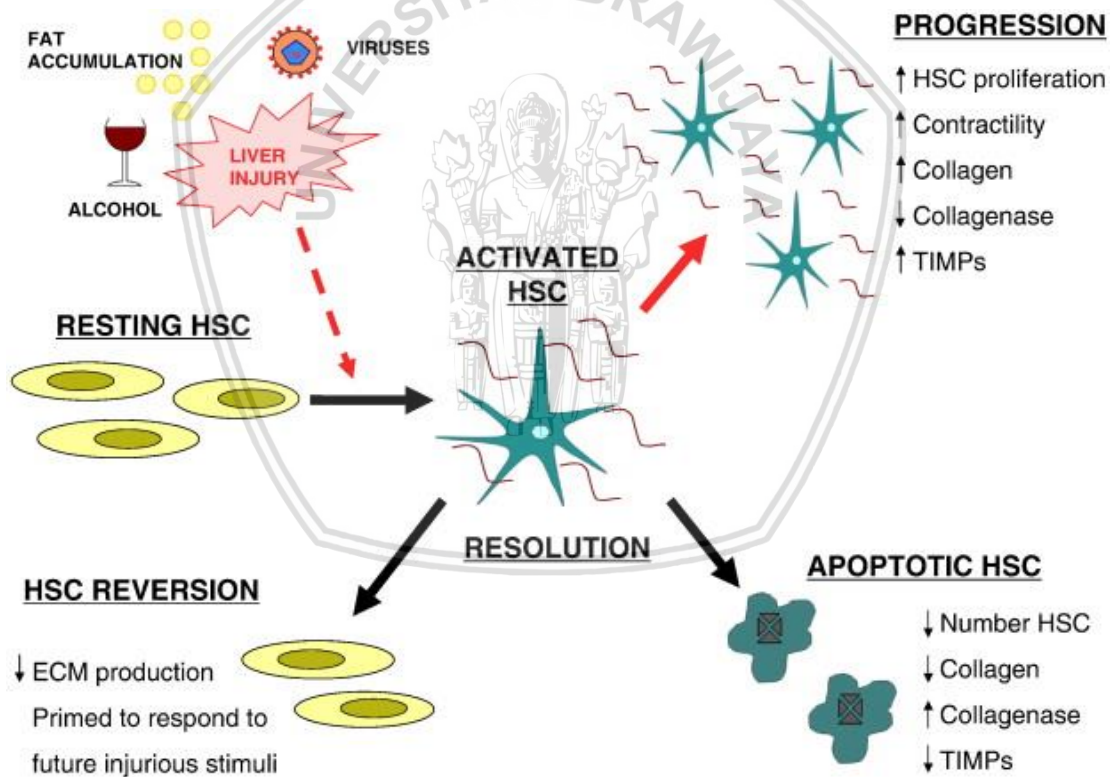
2.2.1.3. Resolusi Fibrosis

Bukti bahwa fibrosis dan bahkan sirosis bersifat reversibel merupakan pemahaman yang sangat menarik dalam regulasi degradasi matriks dan resolusi fibrosis, dengan harapan ditemukan terapi jalur-jalur endogen yang dapat memulihkan penyakit. Kerusakan awal dari sel hati yang ditandai oleh patologi proses degradasi matriks dapat merusak homeostasis hati. Kemudian, pada awal kerusakan hepar MMPs dengan aktivitas terhadap kolagen tipe IV (MMP-2), mendegradasi *low density basement membrane* di dalam raung subendotelial. Enzim yang mengontrol degradasi matriks terdiri MMPs (dikenal sebagai *matrixins*), yang merupakan enzim *calcium-dependent* yang secara spesifik mendegradasi ECM kolagen maupun non kolagen.^{50,51}

HSCs merupakan kunci basement membrane protease berturut-turut dari yang paling kuat memiliki aktivitas degradasi ECM adalah MMP2, MMP9, MMP-3 dan MMP-13. Determinan mayor dari progresifitas fibrosis adalah kegagalan untuk mendegradasi peningkatan *fibril-forming* atau *scar matrix*. Kolagen utama dalam fibrosis hati berturut-turut dari yang terbesar adalah kolagen tipe I, IV dan III. Peran MMP-2 (dikenal sebagai *gelatinase-A*) dalam proses fibrogenesis masih belum jelas, diduga MMP-2 mempunyai sifat anti-fibrotik dengan mempengaruhi derajat deposisi kolagen hati selama aktivasi HSCs.¹¹ Pada penelitian lain MMP-2 memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan tipe lainnya karena kemampuannya dalam

mendegradasi dua tipe kolagen dekaligus (kolagen tipe I dan IV).^{12,13} MMP-2 menginduksi terjadinya resolusi dengan meningkatkan apoptosis HSCs tanpa meningkatkan proses reversi dari HSCs. Proses reversi memungkinkan terjadinya fibrosis hati yang lebih berat jika terpapar kembali oleh agen-agen hepatotoksik.^{52,53}

TIMP-2 diduga mempunyai efek pro-fibrotik karena dapat menginduksi injuri, mengaktifasi miofibroblas dan menghambat secara kuat aktivitas MMP-2 dan pro MMP-2.²³ TIMP-2 lebih spesifik sebagai marker pada fibrosis hati dibandingkan TIMP-1 yang dapat meningkat pada keadaan fibrosis di paru-paru, ginjal dan pankreas.⁵⁴



Gambar 2.2. Progresi dan Resolusi pada Fibrosis Hati.⁵²

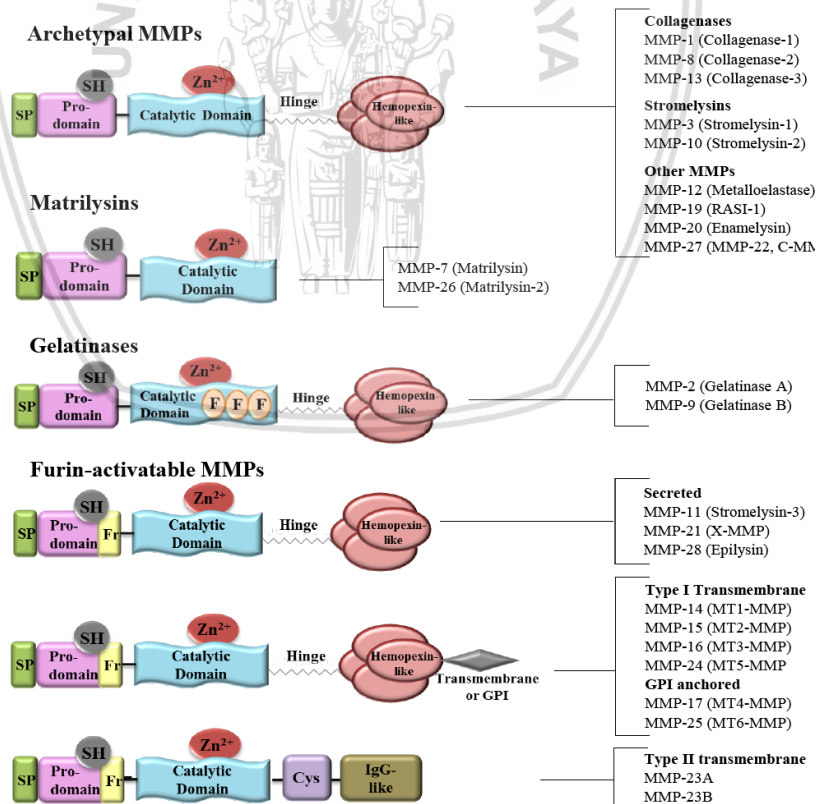
2.3. ECM : Sintesis dan Degradasi pada Fibrosis Hati

Di jaringan hati normal terdapat ECM yang terbentuk dari komponen struktural (Kolagen tipe I, IV, V, elastin dan fibronectin) serta komponen protein non struktural (olfactomedin-4, thrombospondin-4, armadillo repeat-containing x-linked protein 2 (Armxcx2)). Makromolekul utama terdiri dari kolagen interstisial atau fibrillar (kolagen tipe I,III) yang memiliki densitas tinggi dan kolagen membran basal (kolagen tipe IV) yang memiliki densitas rendah di dalam ruang *Disse*. Kolagen terbanyak pada jaringan hati yang normal adalah kolagen tipe IV.⁵⁵

Pada fibrogenesis terjadi peningkatan jumlah ECM 4 sampai 7 kali lipat, dimana beberapa kolagen yang berperan penting dalam fibrosis hati adalah kolagen tipe I, III dan IV. Kolagen tipe I dan III akan menggantikan sebagian kolagen IV pada saat terjadi fibrosis hati. *Glikoprotein adhesif* yang dominan laminin yang membentuk membran basal dan fibronectin yang berperan dalam proses perlekatan, diferensiasi dan migrasi sel. Proteoglikan merupakan protein yang berperan sebagai tulang punggung ECM dalam ikatannya dengan glikosaminoglikan. Pada fibrogenesis terjadi peningkatan fibronectin, asam hialuronat, proteoglikan dan berbagai glikokonjugat. Pembentukan jaringan fibrotik terjadi karena sintesis matriks yang berlebihan dan penurunan penguraian matriks. Penguraian matriks tergantung kepada keseimbangan antara enzim-enzim yang melakukan degradasi matriks dan inhibitor enzim-enzim tersebut. Akumulasi ECM lebih sering berawal dari ruang *Disse* perisinusoid terutama pada metabolic zone 3 di asinus hati (perivenous) menuju fibrosis perisentral.³²

HSCs sebagai sumber utama fibrogenesis pada kerusakan hati (>80%). Sel tersebut memproduksi komponen ECM dalam jumlah besar dan juga mengatur pemecahan ECM. Ternyata selain HSCs, miofibroblas juga diproduksi oleh portal dan BMF (*bone marrow fibroblast*) (10-15%) dan sisanya oleh EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*).^{4,18}

Degradasi ECM dilakukan oleh kelompok enzim yang dinamakan MMP. MMP penting untuk berbagai proses yang terkait dengan proses regenerasi matriks, termasuk pada fibrosis hati. MMP terbagi menjadi empat sub kelompok berdasar struktur dan preferensi substrat, yaitu, kolagenase interstitial, gelatinase, stromelysin dan tipe membran MMP.³²



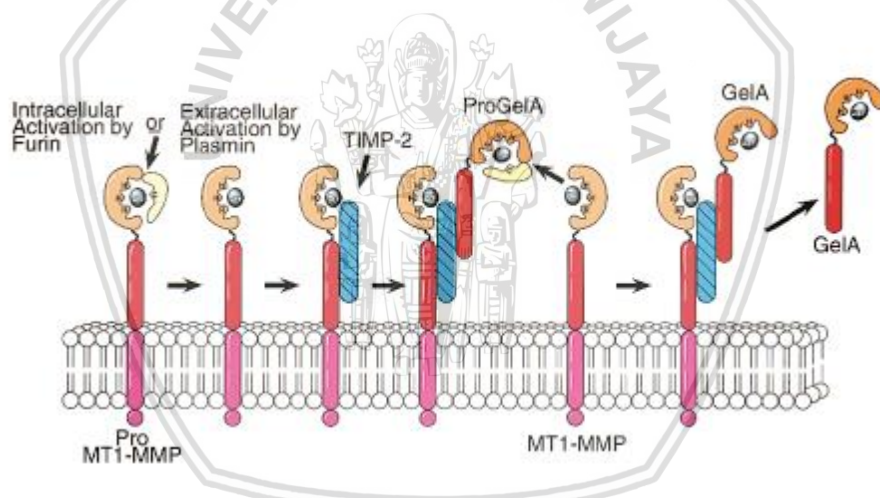
Gambar 2.3. Struktur MMPs.⁸³

Gelatinase, yang juga dikenal sebagai kolagenase tipe IV bekerja dalam mendegradasi gelatin (didenaturasi kolagen) dan kolagen tipe I, IV, V, VII, dan X. Jenis kolagen IV sangat banyak di membran dasar, yang memisahkan parenkim organ dari stroma yang mendasari. Enzim ini juga memecah anggota yang berbeda, dikenal sebagai gelatinase A (MMP-2) dan gelatinase B (MMP-9). Umumnya, kedua gelatinases dianggap memiliki spesifisitas substrat yang sama. MMP-2 memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan MMPs yang lain dalam fibrosis hati, yaitu kemampuan dalam mendegradasi dua tipe kolagen terbesar yang bertanggung jawab terhadap proses fibrosis hati (Kolagen tipe I dan Kolagen IV).^{13,56} MMP-2 memiliki 3 fibronektin tipe II pada domain katalisis sehingga mampu mendegradasi ECM lebih besar.⁸³ MMP-2 disekresi dalam bentuk pro enzim (Pro MMP-2) yang akan diaktivasi jadi MMP-2 dengan bantuan MT1 MMP (MMP-14) melalui suatu proses yang melibatkan TIMP-2.⁸⁶

Degradasi matriks selalu sejalan dengan enzim penghambatnya yaitu *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) yang menjaga homeostasis matrik ekstraseluler hati. Terdapat empat inhibitor alami yang merupakan inhibitor spesifik MMP, yaitu TIMP -1, -2, -3, dan -4. TIMP secara reversibel menghambat aktivasi MMP dengan membentuk ikatan kuat kompleks non-kovalen, mengakibatkan hilangnya aktivitas proteolitik.⁵⁷

Peran TIMP-2 dalam proses fibrogenesis hati sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. TIMP-2 diduga mempunyai efek pro-fibrotik karena dapat menginduksi injuri, memiliki efek anti apoptosis, mengaktivasi miofibroblas, menghambat secara kuat aktivitas MMP-2 dan pro MMP-2.²³ TIMP-2 lebih spesifik

sebagai marker pada fibrosis hati dibandingkan TIMP-1 yang dapat meningkat pada keadaan fibrosis di tempat lain seperti di paru-paru, ginjal dan pankreas.²⁴ TIMP-2 menghambat aktivasi MMP-2 melalui ikatan MT1 MMP pada domain N-terminal TIMP2, sementara domain C terminal TIMP-2 berikatan dengan Pro MMP-2 sehingga aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 terhambat.⁸⁶ MMP-2 memiliki afinitas yang lebih tinggi dibandingkan pro MMP-2 untuk berikatan dengan domain C terminal TIMP-2, sementara domain N-terminal TIMP-2 berikatan dengan MT1-MMP sehingga terbentuk 3 kompleks molekul. Jika 3 kompleks molekul berturut-turut terbentuk akan memicu autokatalisis dari MMP-2.⁸⁹



Gambar 2.4. Aktivasi MMP-2 dan Penghambatan oleh TIMP-2.⁸⁶

2.4. Ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 Jaringan Hati pada Fibrosis dan Fibrolisis Hati

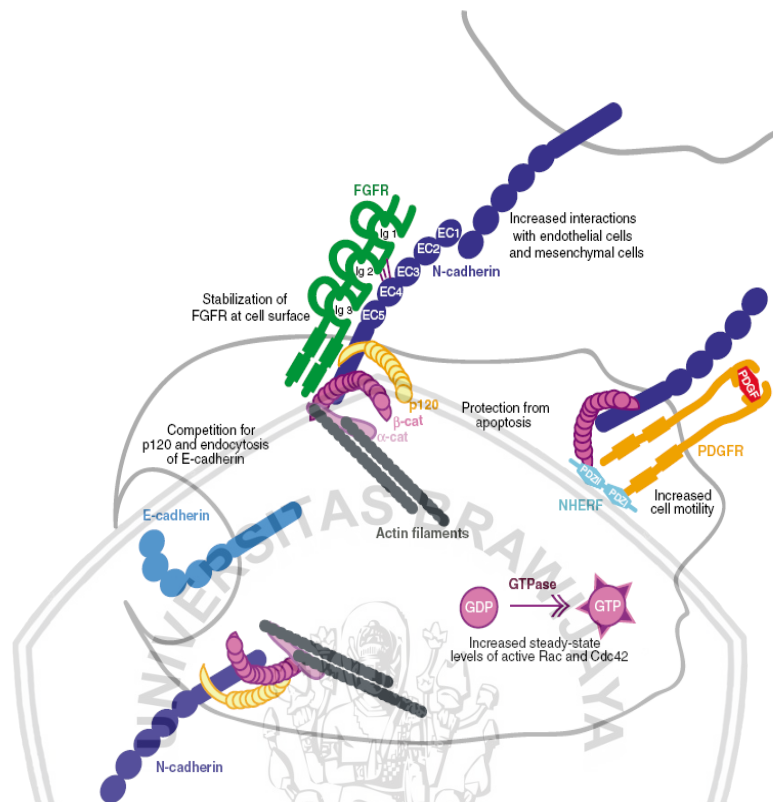
Fibrosis hati awalnya dianggap sebagai kondisi ireversibel, namun dengan perkembangan pengetahuan tentang patogenesis fibrosis hati menunjukkan bahwa fibrosis hati merupakan keadaan yang reversibel.⁵⁹ Salah satu yang bertanggung jawab proses resolusi fibrosis hati secara spontan adalah apoptosis HSCs dan

perubahan degradasi matrik ekstraselular menuju ke arah perbaikan histologi jaringan hati.⁵ Resolusi fibrosis hati melibatkan *remodelling* dan pemecahan beberapa komponen ECM, terutama degradasi kolagen tipe I, salah satu komponen utama dari ECM. Satu penelitian melaporkan bahwa peningkatan MMP-2 selama proses fibrosis hati diduga merupakan mekanisme penting dalam menghambat *aHSC* untuk mensintesis kolagen tipe I.⁷

Peran MMP-2 (dikenal sebagai *gelatinase-A*) dalam proses fibrogenesis masih belum jelas, diduga MMP-2 mempunyai sifat anti-fibrotik dengan mempengaruhi derajat deposisi kolagen hati selama aktivasi HSC.⁸ MMP-2 memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan MMPs yang lain dalam fibrosis hati, yaitu kemampuan dalam mendegradasi dua tipe kolagen terbesar yang bertanggung jawab terhadap proses fibrosis hati (Kolagen tipe I dan Kolagen IV).^{12,13} MMP-2 akan berikatan dengan integrin $\alpha V\beta 3$ pada domain hemopexin terminal C yang selanjutnya akan menyebabkan degradasi ECM.⁸⁸

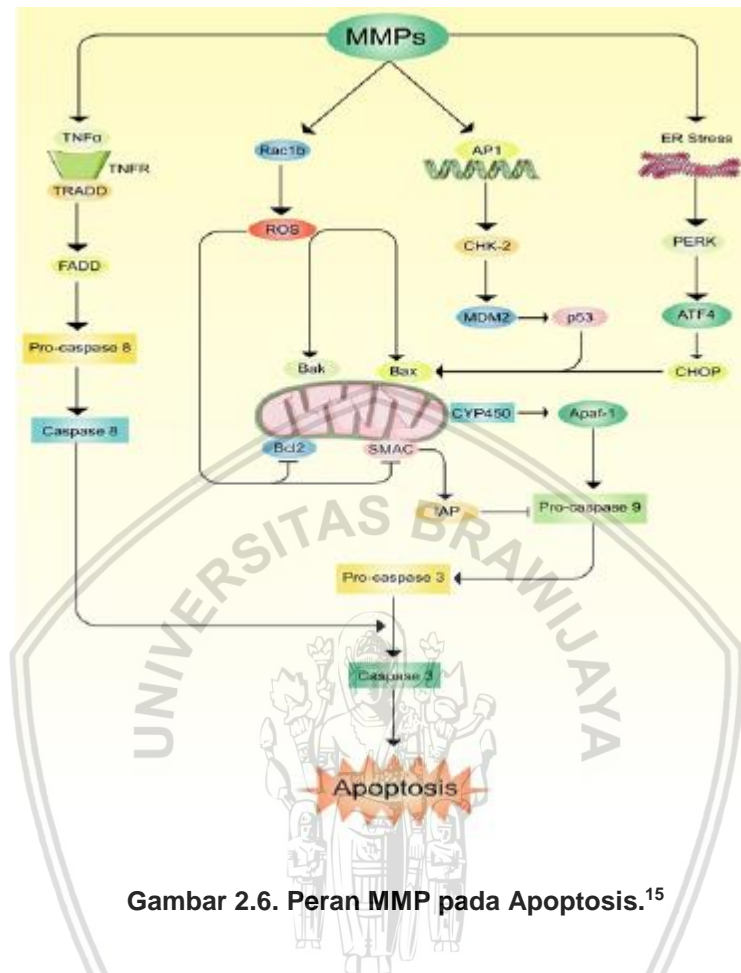
Penelitian saat ini difokuskan pada miofibroblas sebagai kunci utama yang terlibat pada fibrogenesis. Miofibroblas merupakan sel yang proliferasif yang dapat menunjukkan peningkatan kemampuan migrasi dan akumulasi pada tempat terjadinya kerusakan hati sebagai respon terhadap stimulus dan dapat memproduksi ECM. Beberapa penelitian berfokus pada HSCs sebagai sumber utama fibrogenesis pada kerusakan hati (>80%). Sel tersebut memproduksi komponen ECM dalam jumlah besar dan juga meregulasi pemecahan ECM. Selain HSCs, miofibroblas juga diproduksi oleh *bone marrow fibroblast* (10-15%) dan sisanya oleh EMT.^{17,18}

Saat ini EMT diduga sebagai suatu mekanisme dimana EMT dapat memproduksi miofibriblas. EMT merupakan proses biologi kompleks yang memiliki kemampuan migrasi, invasif, resisten terhadap apoptosis dan memproduksi ECM dalam jumlah besar. Saat terjadi proses fibrosis baik di hati, paru, ginjal maupun sel – sel payudara, akan memicu EMT process yang menghasilkan miofibroblas dan ECM berlebihan. Proses ini dipicu oleh sitokin-sitokin proinflamasi dan TGF- β 1. Selanjutnya hal ini merangsang meningkatnya produksi MMP-2 yang memiliki kemampuan dalam menghambat aktifitas EMT sekaligus mendegradasi ECM yang dihasilkan oleh EMT. MMP-2 memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas *bone marrow fibroblast* dan EMT, mendegradasi ECM dan menginduksi apoptosis miofibroblas yang dihasilkan keduanya melalui hambatan terhadap SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) sehingga terjadi hambatan proliferasi dan migrasi dari EMT dan BMF.^{17,19,20,85} E cadherin merupakan suatu protein transmembrane yang bertanggung jawab terhadap adhesi dari sel-sel epithel. Pada saat terjadi fibrosis hati, akan terbentuk suatu miofibroblas yang merupakan sel mesenkim, dimana adhesi dari sel mesenkim dilakukan oleh n cadherin. Pada fibrosis hati terjadi transformasi E-cadherin menjadi N-cadherin, sehingga ekspresi e cadherin akan berkurang melalui suatu proses endositosis dan kompetisi terhadap ikatan p120 katenin. Ekspresi E-cadherin yang berkurang akan memicu ekspresi MMP-2 semakin meningkat.^{59,87}



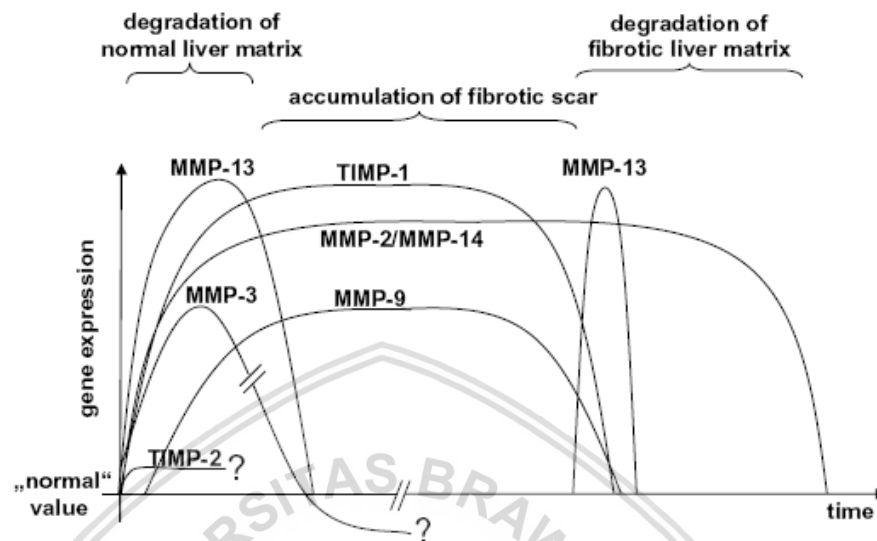
Gambar 2.5. Transformasi E-cadherin menjadi N-cadherin.⁸⁷

MMP-2 juga menyebabkan pelepasan sel parenkim dari ECM sehingga terjadi apoptosis melalui “anoikis”.⁶⁰ MMP-2 menginduksi apoptosis *aHSC* melalui peningkatan pemecahan N-cadherin yang menghambat pelepasan *Bcl-xl* (*B cell lymphoma-extra large*, suatu gen anti apoptosis) dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* (*Bcl2-associated X protein*, suatu gen pro apoptosis).^{15,16}



Gambar 2.6. Peran MMP pada Apoptosis.¹⁵

Peran TIMP-2 dalam proses resolusi fibrosis hati sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti.¹⁰ TIMP-2 diduga mempunyai efek pro-fibrotik karena dapat menginduksi injuri, mengaktivasi miofibroblas dan menghambat secara kuat aktivitas MMP-2 dan pro-MMP-2 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.²³



Gambar 2.7. Peran MMP dan TIMP pada Injuri Hati Kronis.¹⁰

Ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 dapat terdeteksi sebagian besar pada HSC dan sebagian kecil pada sel endothelial, sedangkan pada sel Kupffer ekspresinya tidak mengalami perubahan.²⁰⁻²¹ Ekspresi MMP-2 meningkat 7-12 kali pada HSC yang mengalami fibrosis.²² Ekspresi TIMP-2 meningkat 5-7 kali pada HSC yang mengalami fibrosis.¹⁰

2.5. Efek Fibrogenik Karbon Tetraklorida (CCL₄)

Karbon tetraklorida dapat digunakan sebagai obat penginduksi hepatotoksik. Parasetamol (asetaminofen) dan ethanol merupakan penyebab paling sering kerusakan hati yang dimetabolisme oleh *cytochrome P450 dependent monooxygenase* menjadi metabolit yang reaktif. CCL₄ merupakan zat organik yang digunakan secara luas sebagai bahan pembersih. CCL₄ bersifat hepatotoksik

bergantung pada dosis yang menginduksi kerusakan hati akut dan kronis hingga menyebabkan fibrosis.⁶³

Karbon tetraklorida akan dimetabolisme dan menginduksi kerusakan hati. Aktivasi metabolisme diperankan terutama oleh enzim Cyp450 2E1 di retikulum endoplasmic hepatosit. Melalui mekanisme ini, radikal CCL_3 dan $\text{CCL}_{10}\text{O}_2$ akan dibentuk yang nantinya berikatan kovalen dengan protein, lipid dan asam nukleat kemudian menginduksi kerusakan hati dan menginisiasi peroksidasi lipid.⁶⁴⁻⁶⁵

Peroksidasi lipid di membrane sel melalui ROS, seperti *superoxide radical* (O_2^-) dan hydroxyl radical (OH^\cdot) dan menimbulkan kerusakan komponen sel dan kematian sel. Saat ini CCL_4 tidak hanya sebagai penyebab primer kerusakan hati tetapi juga apoptosis hepatosit.⁶⁵

Paparan CCl_4 juga menyebabkan apoptosis hepatosit dari jalur intrinsik, dimana keberadaan ROS yang telah disebutkan sebelumnya, akan menjadi sinyal intraseluler yang menyebabkan terjadi disfungsi dari mitokondria. Akibatnya, akan terjadi gangguan dari arsitektur organela dan permeabilitas membran sel, serta pelepasan protein-protein mitokondrial ke dalam sitosol, yang berkontribusi terhadap aktivasi dari protease (dalam hal ini adalah kaspase, suatu enzim proteolitik) untuk memicu suatu apoptosis hepatosit, dimana keterlibatan mitokondria tersebut akan mengamplifikasi sinyal apoptotik dari *death receptor*.¹⁰⁸

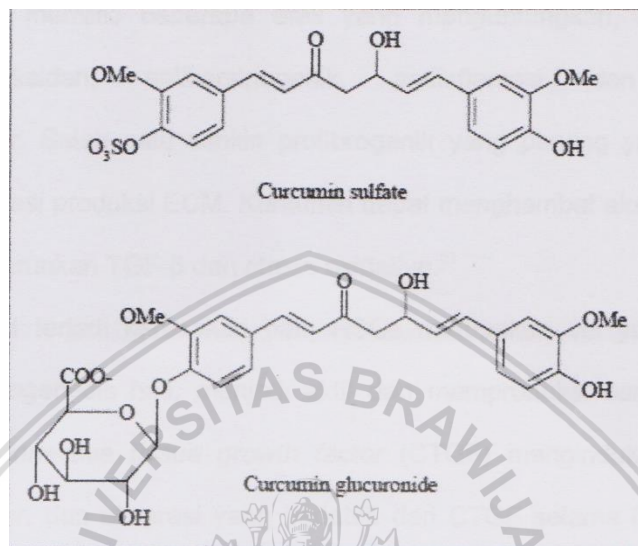
Dari penelitian oleh Shi, dkk, tahun 1998, pada tikus yang diinjeksi dosis tunggal karbon tetraklorida, didapatkan bukti histopatologis bahwa selain nekrosis, juga terdapat apoptosis pada zona sentrilobular. Setelah terjadi nekrosis hepatosit pada 6-12 jam paska injeksi karbon tetraklorida, akan diikuti apoptosis pada sel-sel

yang lain pada 24-48 jam berikutnya. Hanya saja untuk persentase dari apoptosis dan nekrosis yang terjadi dikatakan sulit untuk diketahui karena sulit untuk melihat keutuhan membran plasma yang menjadi acuan dari nekrosis sel. Kesimpulannya, bahwa terbukti adanya ko-eksistensi dari apoptosis bersama dengan nekrosis hepatosit sebagai mekanisme hepatotoksitas karbon tetraklorida dan dianggap ikut berperan penting pada fibrosis hati tikus yang diinduksi karbon tetraklorida.¹⁰⁹

Pada penelitian sebelumnya CCL₄ menimbulkan kerusakan hati pada tikus model fibrosis termasuk nekrosis hepatosit, steatosis dan inflamasi. Dosis rendah dan pemberian jangka panjang CCL₄ dapat menginduksi fibrogenesis hati. Proses terjadinya fibrogenesis membutuhkan waktu setidaknya 8 minggu. CCL₄ diberikan dengan dosis 1 ml/kgBB setiap hari selama 9 minggu. Lama dan dosis pemberian CCL₄ merujuk pada penelitian sebelumnya yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat*. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan adanya fibrosis S1 setelah dilakukan injeksi CCL₄ selama 2-4 minggu. Fibrosis S-2 terbentuk setelah injeksi CCL₄ selama 5-8 minggu dan fibrosis S-3 didapatkan setelah injeksi CCL₄ selama 9-12 minggu, dan fibrosis S-4 terjadi setelah injeksi 13-14 minggu.⁶⁶

Hati secara cepat memperbaiki kerusakan akibat CCL₄. Oleh karena itu tikus dikorbankan dalam 48 jam setelah injeksi terakhir, dimana waktu itu dapat memberikan hasil yang lebih baik untuk mengevaluasi CCL₄ sebagai penyebab kerusakan hati. Pada penelitian tersebut juga menggunakan kurkumin sebagai agen hepatoprotektif.^{29,66} Pemberian CCL₄ pada dosis yang lebih tinggi dapat

menimbulkan kematian, dimana dosis 5 ml injeksi dapat menimbulkan dosis lethal.⁶⁷



Gambar 2.8. Karbon Tetraklorida dan Metabolismenya.⁴⁶

2.6. Kurkumin sebagai Hepatoprotektor

Kurkumin merupakan zat yang mengandung phenolic berwarna kuning cerah yang didapatkan dari rimpang *Curcuma xanthorrhiza* ROXB (temulawak)

Klasifikasi ilmiah tanaman ini adalah sebagai berikut :⁶⁸

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Zingiberales

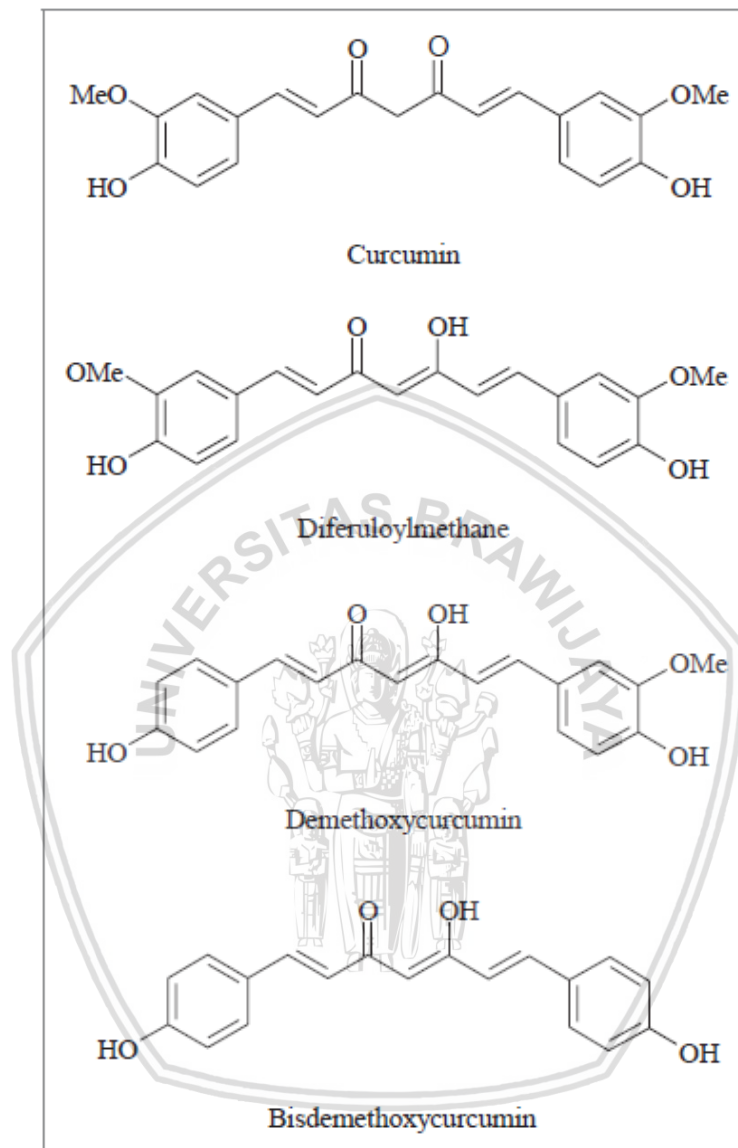
Keluarga : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma*

Spesies : *Curcuma xanthorrhiza* ROXB

Kurkumin merupakan salah satu bahan aktif yang diisolasi dari temulawak (*Curcuma xanthorriza roxb*) yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti di Indonesia. Di Jawa sering tumbuh liar di pekarangan, pinggir jalan dan lereng-lereng sungai. Rimpangnya menjadi komoditi penting sejak dahulu sebagai bahan jamu, penghasil zat warna dan aromatikum. Secara tradisional rimpang temulawak digunakan untuk peluruh batu empedu, pelancar ASI, pelancar pencernaan, penurun panas, peluruh batu ginjal, menurunkan kolesterol dan untuk merangsang nafsu makan.

Kurkumin atau bis-(4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl)-methane juga dikenal sebagai diferuloyl-methane. Kurkumin berupa kristal berwarna kuning gelap, tidak larut dalam air atau eter, larut dalam alkohol. Dalam larutan basa kurkumin menghasilkan larutan yang berwarna merah kecoklatan yang apabila ditambahkan larutan asam akan berubah warna menjadi kuning. Kurkumin memiliki rumus molekul $C_{21}H_{20}O_6$ dan berat molekul 368,38 gram/mol.⁶⁸



Gambar 2.9 Struktur Kimia Kurkumin dan 3 Analognya.⁷²

Di alam, kurkumin selalu terdapat bersama dengan dua senyawa turunan lainnya yaitu demetoksikurkumin dan bis-demetoksikurkumin, yang dikenal dengan nama kurkuminoid. Stabilitas kurkumin dalam media berair dalam berbagai macam pH, kurkumin dalam larutan berair mengalami reaksi degradasi hidrolitik. Kurkumin

pada $\text{pH} < 7$ cukup stabil, praktis tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik.⁶⁹

Kurkumin merupakan senyawa antioksidan yang baik karena mampu menangkap radikal-radikal bebas (radikal oksigen, nitrogen, superoksida, dan hidroksil) yang berperan sebagai inisiator dalam reaksi oksidasi, menetralkan radikal-radikal bebas tersebut.⁷⁰

Analisis struktur kurkumin dan fungsinya antara lain :⁶⁹

- Gugus OH fenolik berperan dalam aktivitas antioksidan.
- Gugus β -diketon berperan dalam aktivitas antiinfeksi, antikanker dan antimutagenik.
- Ikatan rangkap berperan dalam aktivitas antiinfeksi, antikanker dan antimutagenik.

2.6.1 Turunan Kurkumin yang Tersubstitusi pada Atom C-4

Struktur kurkumin memiliki 2 gugus keton yang berdampingan, sehingga memungkinkan terjadinya tautomeri keto-enol. Kurkumin cenderung berada dalam bentuk tautomer enol akibat kecenderungannya untuk mempertahankan ikatan hidrogen intramolekular antara proton enolik dengan atom O gugus β diketon. Modifikasi struktur adalah memasukkan gugus yang mempunyai sifat lipofilik, elektronik dan sterik tertentu pada struktur senyawa yang memberikan aktivitas lebih tinggi, sama atau lebih rendah dibanding senyawa kurkumin sebagai induknya. Kurkumin dan beberapa senyawa turunan kurkumin yang tersubstitusi pada atom C-4 menentukan aktivitas antiinflamasi.⁷¹

Dalam penelitian telah disintesis enam turunan kurkumin yaitu 4-alkil-kurkumin yang terdiri dari: 4-metil; 4-etil; 4-n-propil; 4-isopropil; 4-n-butil dan 4- benzilkurkumin.

Selain itu telah disintesis pula tujuh turunan kurkumin yang lain yaitu 4-aril-kurkumin yang terdiri dari: 4-fenil; 4 (*p*-klorofenil); 4-(*p*-fluorofenil); 4-(*p*-metoksifenil); 4 (*p*-metilfenil); 4 (*m*-trifluorometilfenil) dan 4-(*o,p*-dinitrofenil) kurkumin. Dari enam turunan 4-alkil kurkumin yang telah disintesis, 4-metil kurkumin memberikan aktivitas anti-inflamasi yang ekuivalen dengan kurkumin, namun memanjangkan dan mencabangkan rantai alkil akan menurunkan aktivitas anti-inflamasinya. Aktivitas anti-inflamasi senyawa 4-alkil kurkumin dari besar ke kecil berturut-turut adalah: 4-metil > 4-etil > 4-n-propil > 4-n-butil > 4-isopropil > 4-benzil kurkumin. Sedangkan dari tujuh turunan 4-aril kurkumin, 4-(*p*-metoksifenil) kurkumin mempunyai aktivitas anti-inflamasi yang setara dengan kurkumin.⁷¹

Senyawa 4-fenil kurkumin merupakan kristal warna orange yang memiliki titik lebur 203-206°C, rumus molekul $C_{27}H_{24}O_6$ dengan BM 444,1578 dan 4-(*p*-metoksifenil) kurkumin merupakan kristal berwarna orange kemerahan yang memiliki titik lebur 168–170°C dengan rumus molekul $C_{28}H_{26}O_7$ dan BM 474,1666. Sedangkan 4-(*p*-metilfenil) kurkumin merupakan kristal berwarna orange yang memiliki titik lebur 185-187°C dengan rumus molekul $C_{24}H_{26}O_6$ dan BM 382,1410.⁷¹

2.6.2 Efek Biologik Kurkumin

Data penelitian pada hewan coba (anjing) kurkumin mempunyai sifat merangsang produksi empedu dan sekresi pankreas. Pemberian kurkumin 0.1- 0.5 % pada tikus selama 7 hari dapat menyebabkan penurunan kadar kolesterol dalam darah. Kurkumin, natrium kurkumin dan turunan semisintetiknya feruloyl-4-hydroxycinnamoylmethane dan bis-4-hydroxycinnamoylmethane mempunyai efek anti radang dan dapat menurunkan kadar SGPT dan juga telah dilaporkan bahwa

kurkumin yang diisolasi dari temulawak ini mempunyai efek antioksidan, dapat menghambat proses lipid peroksidasi dan dapat menurunkan kadar LDL, meningkatkan kadar HDL serta menurunkan kadar trigliserida.⁷³

2.6.3 Farmakokinetik Kurkumin

Kurkumin adalah suatu agen yang multipoten yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit pada zaman dahulu. Pada penelitian uji klinik tahap I kurkumin ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin ini ternyata sangat aman diberikan di dalam tubuh dimana meskipun dosis tinggi diberikan dalam tubuh (12 g/hari) ternyata masih belum menunjukkan efek toksik. Akan tetapi, salah satu kekurangan dari kurkumin ini adalah bioavailabilitas yang rendah.⁷⁴

Bioavailabilitas yang rendah ini dapat dikarenakan beberapa penyebab, yaitu rendahnya aktivitas intrinsik, rendahnya penyerapan, metabolisme yang cepat, produk metabolit yang masih inaktif, serta cepatnya proses eliminasi agen tersebut dari tubuh. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa kurkumin ternyata memiliki aktivitas intrinsik yang kuat, tetapi studi lain menyebutkan bahwa kurkumin memiliki sifat absorpsi yang lambat dan cepatnya agen tersebut dimetabolisme sehingga mengakibatkan rendahnya bioavailabilitas kurkumin di dalam darah.⁷⁴

Sebagai suatu obat, kurkumin telah dibuktikan mampu bekerja dalam meningkatkan regulasi sekaligus menurunkan regulasi kerja suatu protein. Sebagai contoh, kurkumin dibuktikan mampu bekerja sebagai agen anti-kanker dengan cara mempengaruhi kerja protein pro/anti-apoptosis. Kurkumin dibuktikan mampu menginduksi terjadinya apoptosis karena menurunkan aktivasi protein anti-apoptosis Bcl-2 selain itu juga mampu meningkatkan aktivasi enzim caspase pada sel kanker.⁷⁵

2.6.4 Absorpsi Kurkumin

Studi pendahuluan menyebutkan bahwa pemberian kurkumin peroral pada hewan coba ternyata hanya mampu menghasilkan kadar kurkumin serum yang sangat rendah di dalam serum. Salah satu penyebab rendahnya kadar kurkumin serum tersebut ternyata disebabkan karena rendahnya absorpsi agen kurkumin di dalam usus. Penelitian menyebutkan bahwa pemberian 1 mg/kg kurkumin pada tikus Sprague-Dawley ternyata menunjukkan tanda-tanda absorpsi yang lambat. Studi lainnya membuktikan bahwa pemberian 400 mg kurkumin per-oral ternyata hanya dapat menghasilkan kadar kurkumin yang sangat rendah pada darah porta yaitu kurang dari 5 µg/ml setelah 15 menit hingga 24 jam pemberian kurkumin bahkan kurkumin tidak ditemukan pada darah jantung.⁷⁶

Rendahnya kadar kurkumin yang dihasilkan didalam darah tersebut ternyata tidak berubah meskipun diberikan melalui administrasi jalur lain. Penelitian uji coba kurkumin pada mencit yang diberikan kurkumin sebanyak 10 mg/kg melalui intravena ternyata hanya mampu menghasilkan kadar kurkumin serum maksimal sebesar $0,36 \pm 0,05$ µg/ml sedangkan pemberian secara oral dengan dosis yang ditingkatkan 50 kalinya, hanya mampu menghasilkan kadar kurkumin serum sebesar $0,06 \pm 0,01$ µg/ml.⁷⁶

2.6.5 Distribusi Kurkumin

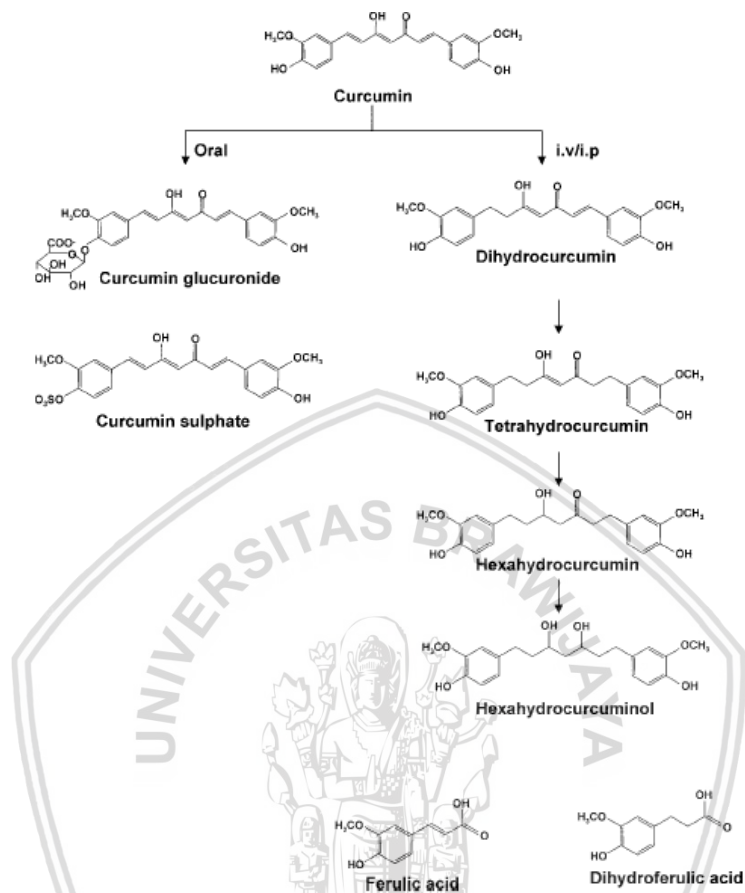
Aktivitas biologis kurkumin sangat dipengaruhi oleh *uptake* dan distribusi dari kurkumin pada jaringan tubuh. Penelitian yang dilakukan oleh Ravindranath *et al*, menyebutkan bahwa pemberian kurkumin per oral sebanyak 400 mg pada tikus akan mengakibatkan timbunan kurkumin dalam jumlah yang sedikit dan tidak berubah pada

hati dan ginjal. Namun, setelah pemberian kurkumin selama 30 menit, 90% kurkumin ditemukan pada lambung dan usus halus sedangkan hanya 1% kurkumin ditemukan pada organ tersebut setelah 24 jam.⁷⁶

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Pan *et al*, yang menggunakan mencit model yang diberikan dengan dosis kurkumin sebesar 1 g/kg yang diberikan melalui intraperitoneal menunjukkan bahwa distribusi kurkumin dengan jumlah paling banyak adalah di usus (117 $\mu\text{g/g}$) setelah 1 jam pemberian kurkumin.⁷³ Pada organ limfa, hati dan ginjal juga ditemukan kandungan kurkumin dalam jumlah sedang dan sedikit kurkumin didapatkan pada jaringan otak. Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin ini didistribusikan ke seluruh tubuh walaupun ketika mencapai jaringan tersebut kadarnya sudah berkurang banyak dibandingkan pada saat pemberian awal.⁷⁶

2.6.6 Metabolisme Kurkumin

Metabolisme merupakan hal yang penting dalam sebuah proses farmakokinetik. Metabolisme kurkumin dalam tubuh telah banyak diteliti. Kurkumin akan dimetabolisme dengan cara konjugasi seperti dilakukan sulfasi dan glukoronidasi pada berbagai macam jaringan. Organ yang paling utama berperan dalam metabolisme kurkumin adalah hepar.⁸⁰ Pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa metabolit utama kurkumin yang terdapat di dalam tubuh adalah glucoronide dari tetrahydrokurkumin (THC) dan hexahydrokurkumin (HHC) baik secara intravena atau intraperitoneal. Hasil metabolit lainnya yang ditemukan di dalam tubuh adalah dihydroferulic acid dan ferulic acid. Hasil metabolisme tersebut mirip ditemukan pada tikus atau manusia.⁷⁶ Secara skematis hasil metabolisme kurkumin dapat dilihat pada gambar berikut ini:

Gambar 2.10 Hasil Metabolisme Kurkumin ⁷⁶

2.6.7 Ekskresi dan Eliminasi Kurkumin

Penelitian menyebutkan bahwa pemberian kurkumin 1 g/mg per-oral pada tikus akan menghasilkan 75% kurkumin yang diekresikan melalui feses dan sedikit melalui urin. Penelitian yang lain yaitu menggunakan pelabelan radioaktif kurkumin menunjukkan bahwa 40% kurkumin akan dibuang di dalam feses dalam bentuk yang tidak diubah dan ditemukan dalam bentuk kurkumin glucuronide atau kurkumin sulphate tetapi hanya sedikit yang dibuang melalui urin.⁷⁶

Pada sebuah studi klinik pada 15 pasien yang diberikan dosis kurkumin antara

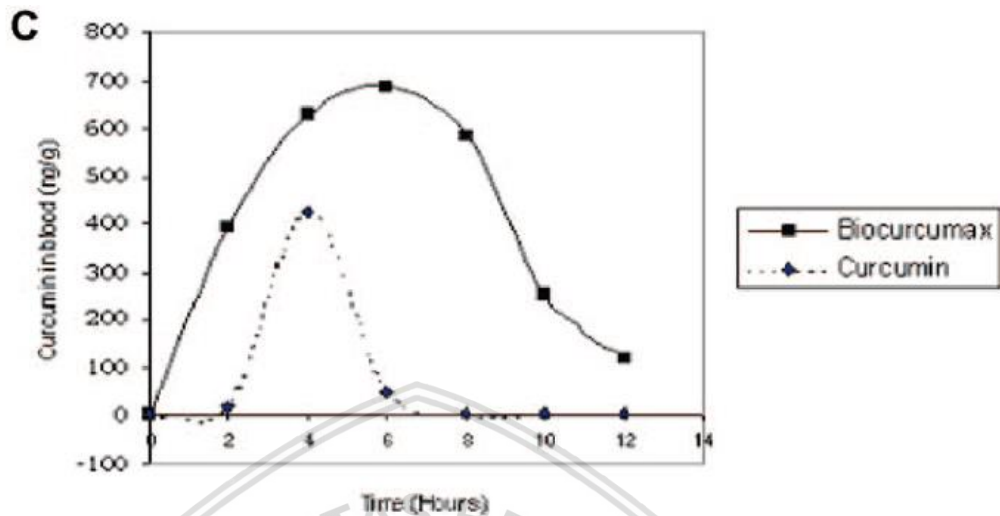
36 hingga 180 mg setiap harinya selama 4 bulan juga tidak menemukan kurkumin ataupun hasil metabolitnya dalam urin pasien tersebut. kurkumin juga didapatkan dieliminasi melalui feses.⁸⁰

Dalam dosis yang lebih kecil, yaitu 1 g/kg kurkumin yang diberikan secara per-oral pada tikus ternyata memiliki waktu paruh selama 1,45 jam. Pada studi lain menunjukkan bahwa waktu paruh eliminasi untuk 10 mg/kg kurkumin yang diberikan secara intravena dan 500 mg/kg kurkumin yang diberikan secara oral adalah $28,1 \pm 5,6$ jam dan $44,5 \pm 7,5$ jam.⁷⁶

2.6.8 Farmakodinamik Kurkumin

Kurkumin adalah senyawa hidrofobik yaitu larut dalam lemak dimana memiliki aktivitas biologis beragam. Hal ini menyebabkan kurkumin sangat mudah untuk memasuki sel dan memberikan efek biologis yang beragam. Untuk memasuki sel, kurkumin berdifusi secara pasif melalui membran sel. Setelah memasuki sel, kurkumin terdistribusi pada setiap komponen di dalam sel, diantaranya adalah membran, sitoplasma, dan inti sel dengan distribusi yang paling banyak adalah membran sel.⁷⁶

Interval pemberian kurkumin berkaitan dengan bioavailabilitas dalam darah. Dari penelitian pada manusia didapatkan kadar kurkumin dalam darah mulai meningkat pada 2 jam setelah pemberian dan mencapai puncak setelah 4 jam pemberian dan menurun sampai 8 jam. Sehingga kurkumin dapat diberikan dengan interval waktu 8 jam dalam sehari. Berikut gambaran bioavailabilitas dari kurkumin dalam darah.⁷⁵



Gambar 2.11 Bioavailabilitas dari Kurkumin dalam darah ⁷⁵

2.6.9 Jangka Waktu Pemberian Kurkumin

Jangka waktu pemberian kurkumin sangat beragam dari penelitian- penelitian yang ada. Mulai dari jangka penelitian yang akut yaitu diberikan hanya sesaat sebelum perlakuan sampai pemberian dalam jangka waktu 18 bulan tergantung tujuan pemberian.⁷⁵

Kurkuminoid dapat dianalisa pada plasma, mukosa intestinal dan jaringan hati pada tikus yang mendapatkan diet kurkumin lebih dari 2 minggu.⁷⁰ Penelitian lain telah dilakukan pada hewan coba bahwa pemberian kurkumin selama 14 hari dapat menurunkan kadar malondialdehid pada kolon tikus dibandingkan dengan kontrol.⁷⁴ Penelitian lain pada tikus yang dilakukan Singh dengan pemberian curcumin selama 14 hari dapat mencegah tumor gastrointestinal yang diinduksi oleh karsinogen.⁷⁵

2.6.10 Toksisitas Kurkumin

Dari sebuah penelitian yang menilai toksisitas akut *C. longa*, termasuk diantaranya LD50 yang diberikan secara peroral, pada kelompok 1 penelitian diberikan normal salin, sedangkan kelompok lainnya diberikan ekstrak kurkumin masing-masing sebesar 250, 500 dan 1000 mg/kg (kelompok 2 sampai dengan kelompok 4), dimana masing-masing kelompok berisi 6 tikus. Adanya kematian pada tikus dalam 48 jam dilakukan pencatatan. Untuk menilai toksisitas kronik, dosis obat yang sama diberikan pada kelompok 1 sampai 4, seperti halnya pada kelompok toksisitas kronik. Ekstrak kurkumin diberikan selama 3 minggu, adanya kematian dan efek pemberian kurkumin dilakukan pencatatan.¹¹⁰

Pengamatan pada kelompok toksisitas akut, dengan pemberian kurkumin tidak didapatkan adanya kematian selama 48 jam. Oleh sebab itu, LD50 dari *C. longa* lebih dari 1000 mg/kg. Pengamatan pada toksisitas kronik dari *C. longa* dievaluasi pada beberapa kelompok dengan dosis yang sama seperti halnya pada kelompok toksisitas akut. Selama penelitian pada kelompok toksisitas akut maupun kronik, pada pemberian ekstrak *C. longa* 1000 mg/kg memberikan beberapa efek diantaranya depresi ringan, nyeri tumpul, penurunan pernafasan, dan penurunan α SMA. Dari penelitian tersebut disimpulkan dengan pemberian dosis besar (1000 mg/kg), *C. longa* bersifat toksik, sehingga pemberian dalam jumlah besar dihindari. Dosis terapi *C. longa* terbatas sampai 500 mg/kg/hari, diberikan secara oral.¹¹⁰

2.6.11 Mekanisme Kerja Kurkumin dalam Menghambat dan Memperbaiki Fibrosis Hati

Karena peran penting HSC dalam patogenesis fibrosis hati, induksi apoptosis HSC berpotensi penting untuk pencegahan atau pengobatan fibrosis hati. Peningkatan apoptosis HSC dapat mengurangi pembentukan prokolagen dan meningkatkan degradasi MES, sehingga membantu pemulihan dari fibrosis hati. Kurkumin tidak hanya menghambat proliferasi HSC dalam fase S dan menginduksi apoptosis, tetapi juga menghambat transformasi HSC dari fenotipe diam ke diaktifkan, dan mengurangi ekspresi aktin otot halus- α , penanda aktivasi HSC. Kurkumin juga mengurangi sekresi kolagen tipe-1 oleh HSC secara *in vitro* dan deposisi kolagen pada hati tikus fibrosis yang diinduksi oleh karbon tetraklorida.¹¹³

Perkembangan fibrosis hati memerlukan perubahan besar baik kuantitas maupun kualitas dari MES. *Remodelling* dari MES baik dalam kondisi normal maupun patologis dikendalikan oleh MMP. Kurkumin telah terbukti menekan invasi tumor melalui *downregulasi* dari MMP dan permukaan sel molekul adhesi. Kurkumin telah diteliti secara luas mengenai potensi hepatoprotektifnya. Biasanya stres oksidatif dan peradangan memainkan peran penting dalam pengembangan alkohol dan asam lemak tak jenuh ganda yang dipanaskan (PUFA) dan CCl₄. Kurkumin karena sifat antioksidan dan anti inflamasi yang efektif, menghambat fibrosis hati. Kurkumin juga dilaporkan mempengaruhi pola ekspresi dari MMP, sehingga dapat menjadi senyawa anti fibrotik yang ampuh.¹¹⁴

Dengan cara melindungi hepatosit dari apoptosis, kurkumin menghambat aktivasi dari HSC, serta memicu apoptosis dari HSC, dan dengan demikian

mengeliminasi sumber utama dari MES. Regulasi jalur mitokondrial dari apoptosis oleh senyawa kurkumin terutama menjelaskan induksi dan perlindungan dari apoptosis *in vitro* dan *in vivo*. Kurkumin mempunyai efek protektif jaringan hati dan menurunkan fibrosis hati dengan menghambat proliferasi HSC dan secara bersamaan menginduksi apoptosis HSC. Hal yang sangat penting, tetapi belum diketahui, adalah jalur sinyal yang menyebabkan apoptosis setelah kontak dengan kurkumin. Namun, ini sangat penting untuk mengembangkan strategi untuk menyembuhkan fibrosis hati dengan menginduksi apoptosis HSC. Dalam studi *in vitro* yang diterbitkan sebelumnya, penghambatan proliferasi dan induksi apoptosis pada HSC tampaknya terkait dengan aktivasi proliferasi peroksisom, regulator kunci baik apoptosis maupun siklus sel normal. Dalam studi tentang sel-sel kanker yang seutuhnya, kurkumin telah terbukti menginduksi apoptosis dengan menurunkan ekspresi faktor anti-apoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-xL serta meningkatkan *caspase* dan faktor pro-apoptosis yaitu Bax dan Bak.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Penelitian ini menunjukkan bahwa setelah pengobatan dengan kurkumin selama 24 jam, apoptosis HSC meningkat secara signifikan dan berkorelasi erat dengan konsentrasi kurkumin yang diberikan. Apoptosis HSC adalah proses yang kompleks yang diatur oleh beberapa jalur molekuler. Hal ini telah ditunjukkan dalam eksperimen dengan kultur HSC, yang baik CD95 (APO-1/Fas) maupun CD95L (APO-1-/Fas-ligan) menjadi semakin berlimpah selama apoptosis. Selanjutnya, apoptosis bisa diblok sepenuhnya oleh antibodi yang mengikat CD95, bahkan dalam HSC yang sudah memasuki jalur apoptosis. Sebaliknya, antibodi yang mengaktifkan CD95 menginduksi apoptosis di lebih dari 95% dari HSC. Ekspresi protein yang meregulasi

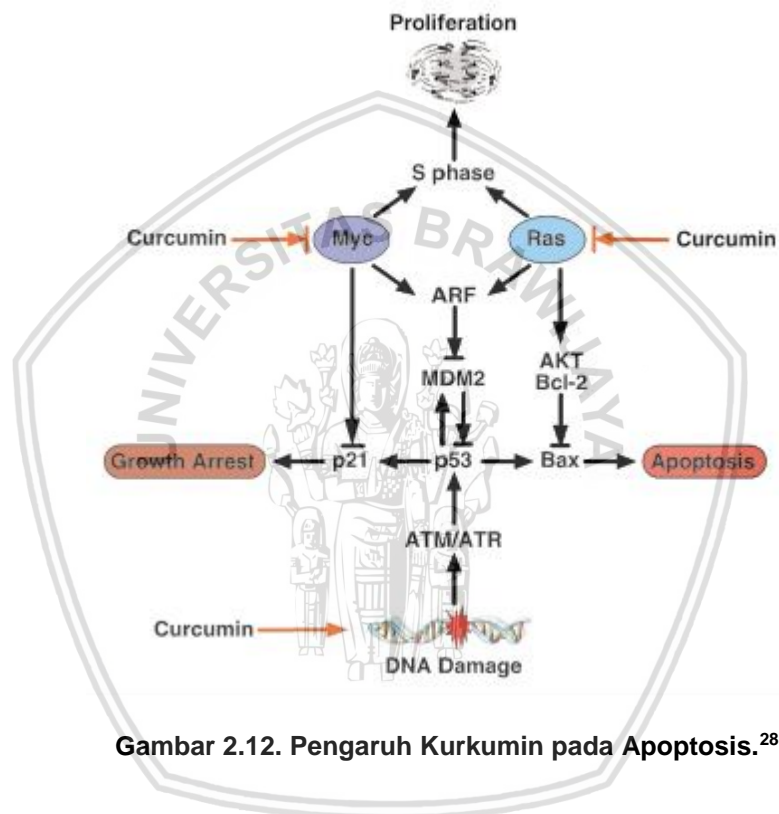
apoptosis, Bcl-2 dan p53 ditemukan meningkat selama apoptosis, yang sangat menarik bahwa sebagai ekspresi p53 bisa diinduksi oleh antibodi yang mengaktifkan CD95. Dalam penelitian ini, kami telah menunjukkan bahwa berlimpahnya Fas dan p53 meningkat secara signifikan pada pengobatan dengan kurkumin, sedangkan Bcl-2 diperoleh penurunan yang sama signifikannya. Data ini menunjukkan bahwa efek terhadap ekspresi faktor pertumbuhan terkait apoptosis setidaknya ikut bertanggung jawab atas apoptosis HSC yang diinduksi kurkumin.¹¹⁶

2.6.12 Mekanisme Kerja Kurkumin pada MMP-2 dan TIMP-2

Kurkumin merupakan fitokimia alami yang banyak dipakai dalam pengobatan penyakit di bidang gastrointestinal. Kurkumin secara dramatis menekan proses peradangan dengan mengurangi kadar sitokin inflamasi, seperti *interferon- γ* , *tumor necrosis factor- α* , dan IL-17. Kurkumin juga meningkatkan kerja dari MMP-2, MMP-9 dan sekaligus menurunkan kerja dari TIMP-1 dan TIMP-2. Pemberian kurkumin dapat menghambat aktivasi sel stromal hati (HSC) sehingga memperbaiki arsitektur hati yang mengalami fibrosis. Kurkumin sebagai anti fibrotik mempunyai beberapa titik tangkap, antara lain menghambat ROS, menurunkan ekspresi *TGF- β 1*, menghambat signaling *TGF- β 1/Smad*, merangsang apoptosis HSC, menghambat *NF- κ B* sehingga mengurangi produksi matriks ekstraselular dan mengaktivasi *PPAR- γ* .^{29,30}

Pengaruh langsung kurkumin terhadap MMP-2 dan TIMP-2 pada fibrosis hati belum banyak dibahas di literatur. Penelitian *in vivo* lain juga memperlihatkan efek kurkumin dalam meningkatkan ekspresi gen MMP-2 pada proses fibrosis hati.²⁶ Pemberian kurkumin juga menunjukkan penurunan ekspresi TIMP-2 pada tikus model fibrosis hati.⁷⁸ Kurkumin menghambat aktivasi protein Ras (suatu protein yang

mengatur proliferasi sel) sehingga akan meningkatkan ekspresi MMP-2 dan menghambat ekspresi TIMP-2 yang selanjutnya akan menghambat jalur *PI3/Akt* dan terjadi hambatan terhadap pelepasan *Bcl-xl* dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* sehingga terjadi apoptosis *aHSC*.²⁸



Gambar 2.12. Pengaruh Kurkumin pada Apoptosis.²⁸

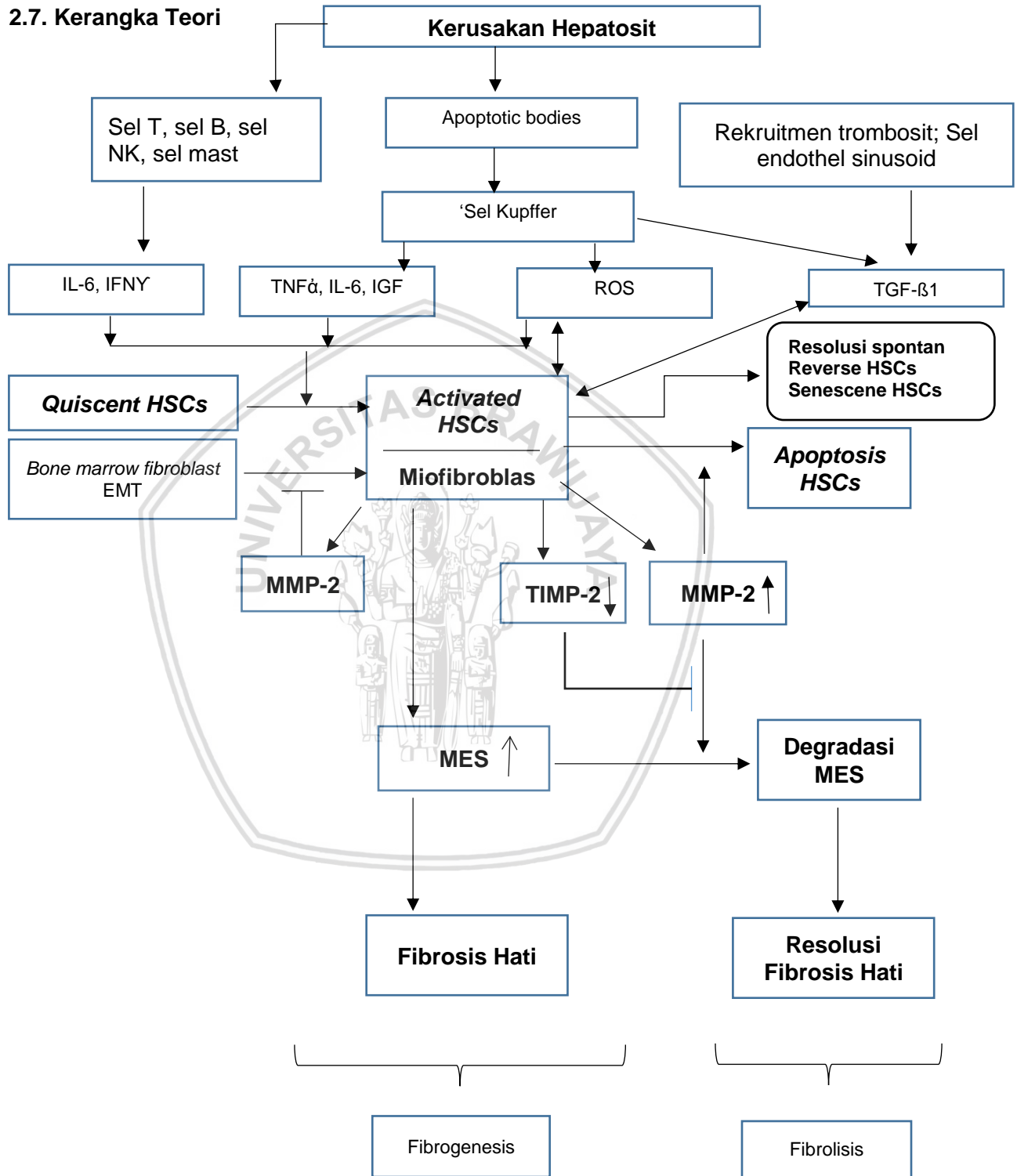
Penelitian Duval et al tahun 2014 menyebutkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen activator inhibitor*) sehingga aktivitas Plasmin dalam menginduksi aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 tetap berlangsung.¹²¹

Pada penelitian Zhao et al tahun 2014 dijelaskan bahwa TIMP-2 dapat mengaktivasi ekspresi gen ERK 1 / 2 dan HIF-1 α dimana kedua gen tersebut bersifat

antiapoptosis terhadap HSCs pada tikus model fibrosis hati. Peran kurkumin pada penelitian tersebut adalah aktivitasnya dalam menghambat ERK 1/2 (Extracellular regulated kinase 1/2) dan HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) sehingga menginduksi terjadinya apoptosis HSCs.¹²²



2.7. Kerangka Teori

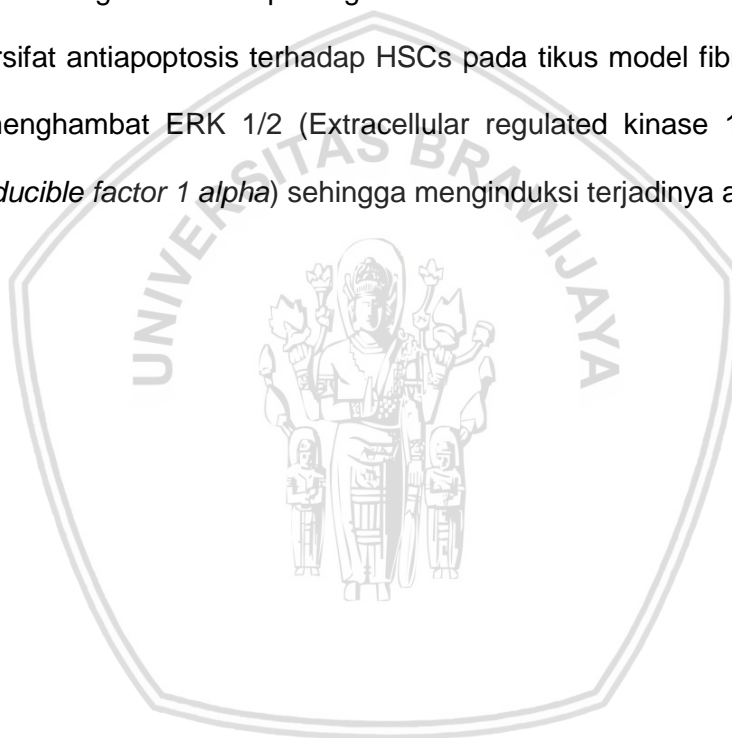


2.8. Penjelasan Kerangka Teori

Adanya kerusakan sel hepatosit akan merangsang sel T, sel B, sel mast, sel NK dan sel dendritik untuk menghasilkan marker inflamasi seperti IL-6, IFN- γ dan IL-17. Sel Kupffer akan melepaskan beberapa sitokin inflamasi diantaranya IL-6, IL-17, IGF, TNF- α , IFN- γ , ROS, Angiotensin II dan TGF- β 1. TGF- β 1 memicu aktivasi HSC menjadi miofibroblas dan lebih lanjut miofibroblas juga akan mensekresi TGF- β 1, dimana akhirnya lebih memicu miofibroblas untuk meningkatkan ekspresi kolagen dalam hati. Miofibroblas merupakan kunci utama proses fibrogenesis yang memicu peningkatan sintesis MES (matriks ekstraseluler). Saat terjadi fibrosis hati, miofibroblas merangsang ekspresi MMP-2 (mendegradasi MES) sekaligus TIMP-2 (menghambat degradasi MES). Miofibroblas sebagian besar dihasilkan oleh aHSC (80%) dan sisanya dihasilkan oleh *bone marrow fibroblast* (10-15%) dan EMT (5%). MMP-2 memiliki kemampuan untuk mendegradasi MES yang dihasilkan oleh ketiganya. MMP-2 memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas *bone marrow fibroblast* dan EMT melalui hambatan terhadap SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) sehingga terjadi hambatan proliferasi dan migrasi dari EMT dan BMF.

Pada saat terjadi proses resolusi hati aktivitas MMP-2 akan meningkat yang akan mendegradasi ECM dan menghambat sintesis kolagen dalam hati. MMP-2 menginduksi terjadinya resolusi dengan meningkatkan apoptosis aHSCs tanpa meningkatkan proses reversi dari HSC. MMP-2 menginduksi apoptosis aHSC melalui peningkatan pemecahan N-cadherin yang menghambat pelepasan *Bcl-xl* (*B cell lymphoma-extra large*, suatu gen anti apoptosis) dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* (*Bcl2-associated X protein*, suatu gen pro apoptosis). MMP-2 juga

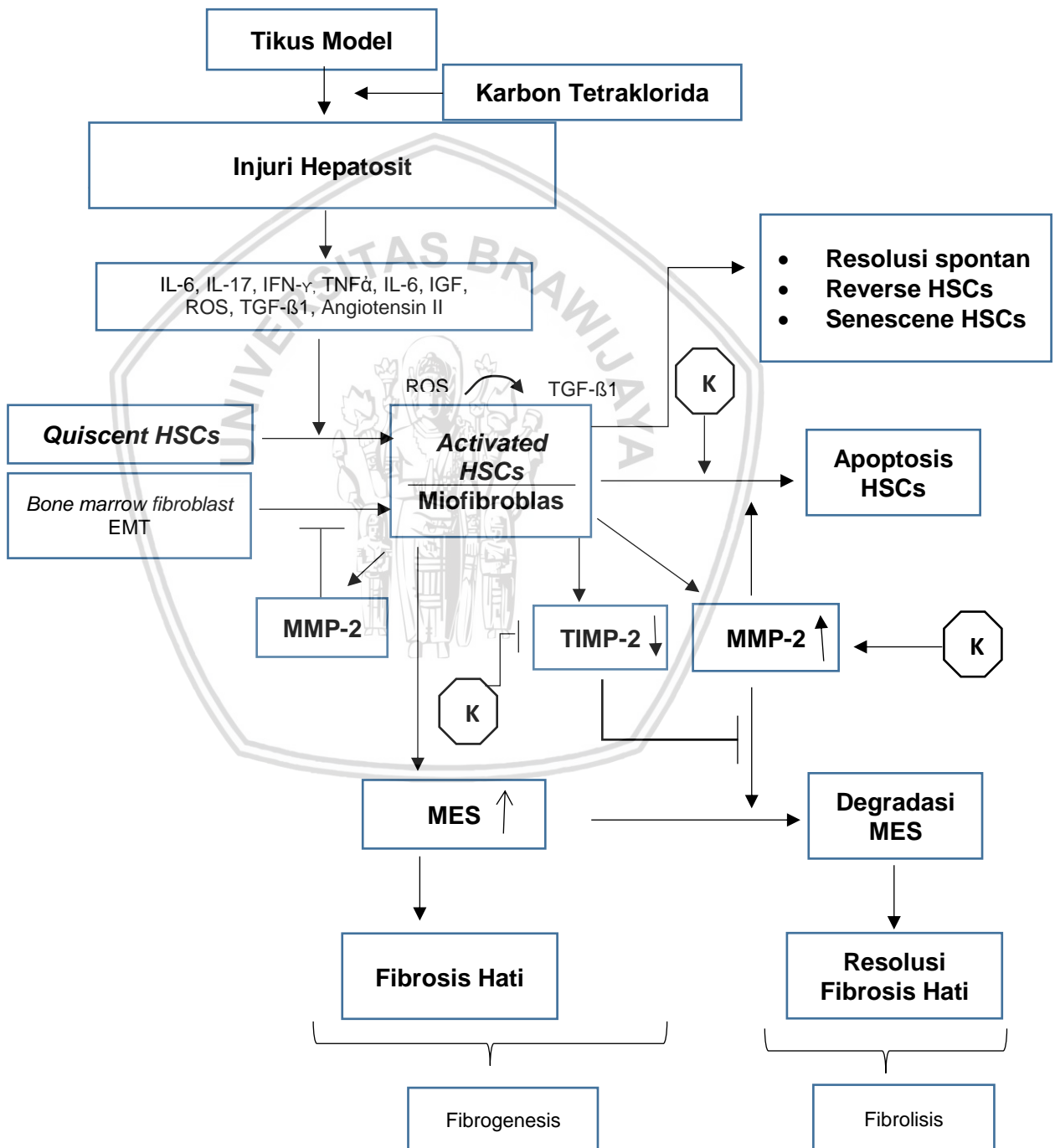
memiliki kemampuan mendegradasi MES melalui ikatan integrin $\alpha V\beta 3$ pada domain hemopexin terminal C yang selanjutnya akan menyebabkan degradasi MES. Kurkumin dapat meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen activator inhibitor*) sehingga aktivitas Plasmin dalam menginduksi aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 tetap berlangsung. TIMP-2 dapat mengaktivasi ekspresi gen ERK 1/2 dan HIF-1 α dimana kedua gen tersebut bersifat antiapoptosis terhadap HSCs pada tikus model fibrosis hati. Peran kurkumin menghambat ERK 1/2 (Extracellular regulated kinase 1/2) dan HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) sehingga menginduksi terjadinya apoptosis HSCs.



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



3.2. Penjelasan Kerangka Konsep

Karbon tetraklorida telah banyak digunakan sebagai penginduksi terjadinya kerusakan hati. Kerusakan hati yang lama yang diinduksi CCL₄ dapat menyebabkan fibrosis hati hingga sirosis hati. CCl₄ dimetabolisme oleh sitokrom p450 2E1 membentuk CCl₃ dan CCl₃O₂. Kedua radikal bebas tersebut berikatan dengan DNA, lipid, protein dan karbohidrat yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, nekrosis sel, deposisi kolagen di hati

Adanya kerusakan sel hepatosit akan merangsang sel T, sel B, sel mast, sel NK dan sel dendritik untuk menghasilkan marker inflamasi seperti IL-6, IFN- γ dan IL-17. Sel Kupffer akan melepaskan beberapa sitokin inflamasi diantaranya IL-6, IL-17, IGF, TNF- α , IFN- γ , ROS, Angiotensin II dan TGF- β 1. TGF- β 1 memicu aktivasi HSC menjadi miofibroblas dan lebih lanjut miofibroblas juga akan mensekresi TGF- β 1, dimana akhirnya lebih memicu miofibroblas untuk meningkatkan ekspresi kolagen dalam hati. Miofibroblas merupakan kunci utama proses fibrogenesis yang memicu peningkatan sintesis MES (matriks ekstraseluler). Saat terjadi fibrosis hati, miofibroblas merangsang ekspresi MMP-2 (mendegradasi MES) sekaligus TIMP-2 (menghambat degradasi MES). Miofibroblas sebagian besar dihasilkan oleh aHSC (80%) dan sisanya dihasilkan oleh *bone marrow fibroblast* (10-15%) dan EMT (*Epithelial mesenchymal transition*) (5%). MMP-2 memiliki kemampuan untuk mendegradasi MES yang dihasilkan oleh ketiganya. MMP-2 memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas *bone marrow fibroblast* dan EMT melalui hambatan terhadap SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) sehingga terjadi hambatan proliferasi dan migrasi dari EMT dan BMF.

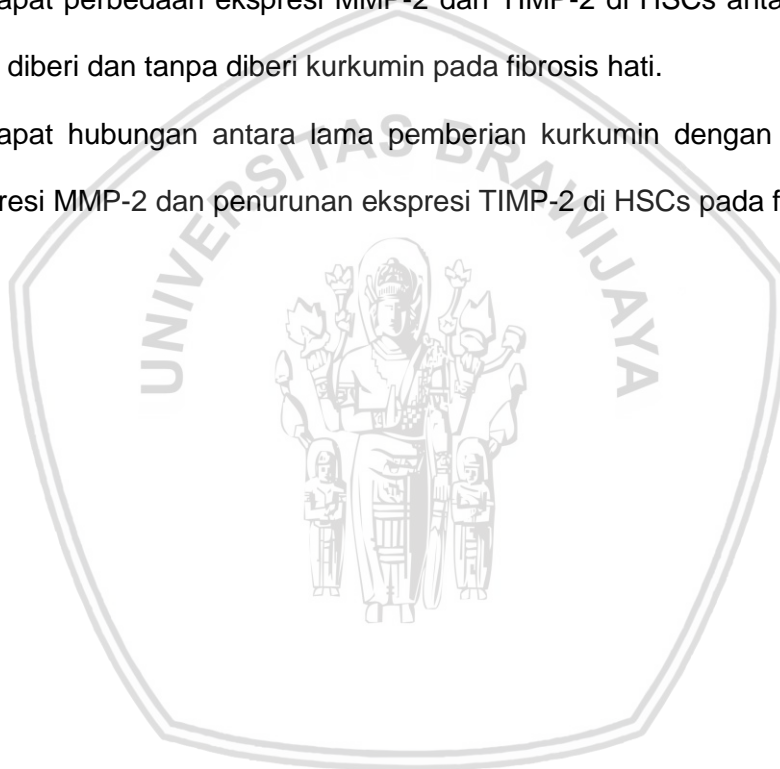
Pada saat terjadi proses resolusi hati aktivitas MMP-2 akan meningkat yang akan mendegradasi MES dan menghambat sintesis kolagen dalam hati. MMP-2 menginduksi terjadinya resolusi dengan meningkatkan apoptosis aHSCs tanpa meningkatkan proses reversi dari HSC. MMP-2 menginduksi apoptosis aHSC melalui peningkatan pemecahan N-cadherin yang menghambat pelepasan *Bcl-xl* (*B cell lymphoma-extra large*, suatu gen anti apoptosis) dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* (*Bcl2-associated X protein*, suatu gen pro apoptosis). MMP-2 juga memiliki kemampuan mendegradasi MES melalui ikatan integrin $\alpha\text{V}\beta 3$ pada domain hemopexin terminal C yang selanjutnya akan menyebabkan degradasi MES.

Kurkumin menghambat aktivasi protein Ras (suatu protein yang mengatur proliferasi sel) sehingga akan meningkatkan ekspresi MMP-2 dan menghambat ekspresi TIMP-2 yang selanjutnya akan menghambat jalur *PI3/Akt* dan terjadi hambatan terhadap pelepasan *Bcl-xl* dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* sehingga terjadi apoptosis aHSC. Kurkumin dapat secara langsung meningkatkan kerja dari MMP-2 dan sekaligus menurunkan kerja dari TIMP-2 sehingga dapat memperbaiki arsitektur hati yang mengalami fibrosis. Kurkumin dapat meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen activator inhibitor*) sehingga aktivitas Plasmin dalam menginduksi aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 tetap berlangsung. TIMP-2 dapat mengaktivasi ekspresi gen ERK 1/2 dan HIF-1 α dimana kedua gen tersebut bersifat antiapoptosis terhadap HSCs pada tikus model fibrosis hati. Peran kurkumin menghambat ERK 1/2 (Extracellular regulated kinase 1/2) dan HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) sehingga menginduksi terjadinya apoptosis HSCs.

3.3. Hipotesis

Dari kerangka konsep di atas maka hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati.
2. Terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada resolusi spontan dan resolusi akibat induksi kurkumin pada fibrosis hati.
3. Terdapat perbedaan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs antara kelompok yang diberi dan tanpa diberi kurkumin pada fibrosis hati.
4. Terdapat hubungan antara lama pemberian kurkumin dengan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*) dengan rancangan acak lengkap.

Pada penelitian ini akan dilakukan perlakuan dengan memberikan kurkumin pada hewan coba yang telah mengalami fibrosis akibat paparan CCl₄. Penelitian dimulai dengan adaptasi (*acclimatized*) tikus selama 7 hari, selanjutnya tikus dibagi secara acak menjadi 8 kelompok.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCL₄ dan pemberian kurkumin dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisis ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian \pm 6 bulan yaitu Juni 2016 - November 2016.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan jenis *Rattus novergicus galur Wistar*. Tikus yang digunakan berusia sekitar 3 bulan.

4.3.2. Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, deasa dengan umur \pm 3 bulan atau 12 minggu dengan berat badan 230-280 gram.

Penentuan besar sampel untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, menggunakan rumus Federer yaitu:⁸¹

$$(t-1)(r-1) / 2 \geq 15$$

dimana, t : banyaknya kelompok perlakuan,

r : jumlah pengulangan (replikasi)

pada penelitian ini $t = 8$, sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

$$((8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7(r-1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 15 + 7$$

$$r \geq 22/7$$

$$r \geq 3,14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

Dengan demikian, jumlah pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 4 sehingga total jumlah tikus yang diperlukan $8 \times 4 = 32$ tikus.

4.3.3. Kriteria Sampel

4.3.3.1. Kriteria Inklusi

- Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* berjenis kelamin jantan.
- Usia ± 3 bulan (12 minggu).
- Berat badan 230-280 gram.
- Kondisi tikus sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi.

4.3.3.2. Kriteria Eksklusi

- Tikus tidak mau makan sehingga mengganggu kesehatan.
- Tikus sakit atau mati selama masa perlakuan.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas (*Independent*)

- a. Paparan kurkumin.
- b. Lama pemberian kurkumin.

4.4.2. Variabel Tergantung (*Dependent*)

- a. Ekspresi MMP-2 di HSCs.
- b. Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Alat

- a. Alat pemeliharaan tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus. Penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

- b. Alat pembuat makanan tikus

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan.

- c. Sonde untuk pemberian perlakuan beserta tube ukuran 1,5 ml dan 15 ml.

- d. Alat pembuat dan pemberian larutan karbon tetraklorida (CCl₄) pipet, beaker glass, spatula, spuit.

- e. Alat Pemeriksaan Patologi Anatomi

Rotari mikrotom merek LEICA, mikroskop cahaya merek Nikon Eclipse C600, engan kamera Nikon digital Net Camera DN100 dengan pembesaran 40x, 100X dan 200X disertai lensa okuler 10X dan lensa obyektif 100X, kaca obyek dan kaca penutup.

4.5.2. Bahan

- a. Hewan coba: tikus jantan *Ratus norvegicus strain winstar* sesuai kriteria inklusi dan drop out.
- b. Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- c. Bahan pembuatan pakan standar: pakan standar tikus berupa konsentrat PARS 22.5 g, tepung terigu 7.5 g, dan air sebesar 10 cc.
- d. Bahan pembuatan larutan karbon tetraklorida (CCl_4): karbon tetraklorida (CCl_4) 10% dan minyak jagung.
- e. Bahan pakan paparan kurkumin
- f. Bahan emulsifier kurkumin : *carboxymethylcellulose*
- g. Bahan reagensia sesuai dengan penelitian ranting.
- h. Bahan untuk pemeriksaan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs
- i. Bahan bedah tikus : alkohol, kapas, gunting, ether.
- j. Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10%, aceton xylol, paraffin cair, paraffin blok, mayer albumin, pewarnaan HE, alkohol 95%, air, hematoksilin, lithium karbonat.

4.6. Definisi Operasional

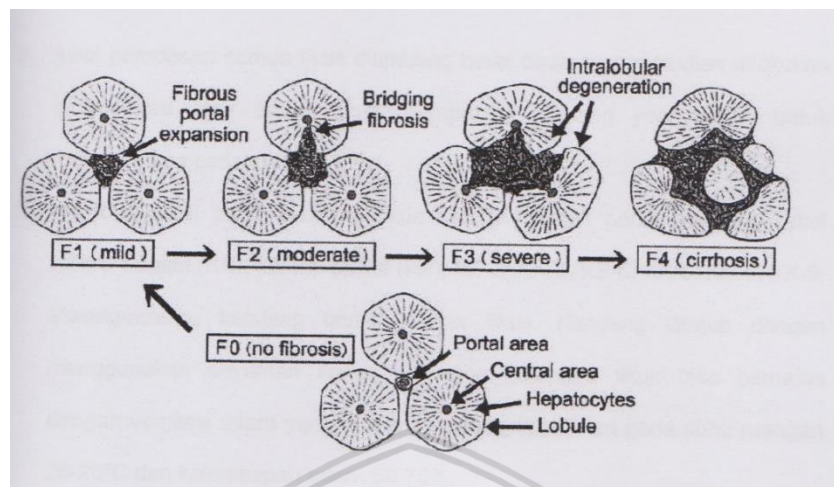
1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus novergicus strain wistar* jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas brawijaya.
2. Diet normal berupa pakan standar konsentrat PARS 22.5 gram, tepung terigu 7.5 gram dan air sebesar 10 cc.
3. Paparan CCl_4 adalah pemberian CCl_4 secara intraperitoneal dengan dosis 1 ml/KgBB, 2 kali seminggu selama 9 minggu.

4. Kurkumin yang digunakan adalah kurkumin (*Curcumin TCI-C0434*). Bahan yang digunakan sebagai pelarut kurkumin adalah *carboxymethylcellulose* 1%.
5. Paparan kurkumin adalah pemberian kurkumin per oral dengan dosis 200mg/KgBB/hari yang diberikan selama 2 minggu pada kelompok KP2, 5 minggu pada kelompok KP5 dan 9 minggu pada kelompok KP9.
6. Kelompok kontrol adalah kelompok yang diberikan pelarut kurkumin (*carboxymethylcellulose* 1%) selama 2 minggu KK2, 5 minggu pada kelompok KK5 dan 9 minggu pada kelompok KK9.
7. *Hepatic Stellata Cells* (HSCs) adalah sel perisinusoidal diantara sel hepatosit, berbentuk seperti bulan sabit, inti bergerigi, mengandung banyak vesikel lemak di dalam sitoplasma.
8. Pengukuran ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 menggunakan metode imunohistokimia. Pembacaan dilakukan di Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga oleh 2 orang pemeriksa yaitu Djoko Legowo, M.Kes., drh. Dan Agung Budianto, drh.. Data setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi, dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif. Skala semikuantitatif IRS adalah hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 10 (Sepuluh) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 100x dan 400x.⁹⁴

Tabel 4.1. Skala semikuantitatif IRS.⁹⁴

A	B
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80%	

9. Ekspresi MMP-2 secara imunohistologi ditandai dengan adanya warna coklat *chromogen* pada *Hepatic Stellata Cells*.
10. Ekspresi TIMP-2 secara imunohistologi ditandai dengan adanya warna coklat *chromogen* pada *Hepatic Stellata Cells*.
11. Tikus model fibrosis hati merupakan tikus yang diberikan injeksi CCl₄ intraperitoneal selama 9 minggu untuk membentuk fibrosis F3.
Derajat fibrosis hati menggunakan system METAVIR dimana:⁴⁶
 - F-0 : tidak ada fibrosis
 - F-1 : ekspansi fibrosis pada area porta tanpa septa (fibrosis ringan).
 - F-2 : septa fibrosis meluas sehingga terjadi *bridging* fibrosis antara struktur pembuluh darah yang berdekatan, baik antara portal ke portal dan portal ke sentral (fibrosis moderate).
 - F-3 : terjadi *bridging* atau septa tanpa sirosis (fibrosis berat).
 - F-4 : terjadi sirosis, jaringan tersusun dari beberapa nodul yang dikelilingi oleh fibrosis.



Gambar 4.1. Derajat Fibrosis Hati pada Inflamasi Kronis.⁶⁶

12. Resolusi spontan fibrosis hati adalah proses pemulihan struktur histopatologis jaringan fibrosis hati setelah faktor penyebabnya dihentikan.^{5,6}

4.7. Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1. Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih

1. Tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
3. Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label control negatif, control positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9 dan KK-9. Masing-masing kandang berisi 4 ekor tikus. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup. Kandang diletakkan pada suhu ruangan 25-28°C dan kelembaban udara 50-70%.
4. Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 3 hari sekali.

5. Memasukkan tikus kedalam kandang yang dibuat dari bak plastic dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih janyan Selama 7 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan. Pada masa adaptasi berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.

6. Memberikan minum dengan aquades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.

7. Memberikan makanan standar konsentrat PARS 22.5 gram, tepung terigu 7.5 gram dan air sebesar 10 cc yang dicampur sebanyak 40 gram untuk setiap tikus.

8. Menginduksi CCl_4 dengan disuntikkan intraperitoneal dosis 1cc/kgBB, 2x/minggu selama 9 minggu pada kelompok perlakuan dan menyuntikkan NaCl 0.9% dosis 1ml/kgBB 2x/minggu sebagai placebo untuk kelompok kontrol negatif.

9. Memberikan kurkumin 200 mg/kgBB peroral sesuai dengan kelompok perlakuan setelah 48 jam paska injeksi.

10. Memberikan pelarut kurkumin (carboxymethylcellulose) 0.7% 1 ml peroral sesuai dengan kelompok perlakuan setelah 48 jam paska injeksi CCl_4 .

4.7.2. Pembuatan dan Pemberian CCl_4

1. Mengambil CCl_4 dengan pipet ukur sebanyak 5 ml.

2. Melarutkan CCl_4 dengan minyak jagung dengan perbandingan 1:9 di dalam beaker glass, yaitu untuk CCl_4 sebanyak 1 ml dan minyak jagung 9 ml dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.

3. Mengambil larutan CCl_4 dengan dosis 1cc/kgBB.

4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Menginduksi CCl_4 dilakukan 2x/minggu. Sebelum melakukan penyuntikan terlebih dahulu membersihkan daerah yang akan disuntik dengan kapas alkohol dengan gerakan melingkar agar steril dan perlu dipastikan sebelum melakukan penyuntikan tidak ada udara karena udara dapat menyebabkan emboli.

4.7.3. Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Setiap perlakuan dibedah sesuai waktu perkiraan terjadinya fibrosis hati tingkat tertentu sesuai dengan penelitian sebelumnya.
2. Tikus dianastesi terlebih dahulu dengan Ether inhalasi.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan sterofoam. Tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas sterofoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral, sehingga organ-organ dalam dan rongga abdomen terlihat.
5. Dilakukan pengambilan jaringan hati kemudian difiksasi dengan formalin 10%.

4.7.4. Pembuatan Imunohistokimia MMP-2 dan TIMP-2 HSCs

1. Pengukuran ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 jaringan hati dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia dilakukan sesuai dengan petunjuk yang diberikan oleh pabrik. Kit imunohistokimia yang digunakan adalah Kit BLOSS USA Anti MMP-2 dan Anti TIMP-2 dengan Antibodi Sekunder dari Scy Tek.
2. Sediaan dipotong dengan mikrotom setebal 4-5 mikron.
 - diperhatikan penomoran preparat dan nama antibody.
 - Lama waktu saat dalam *waterbath*.
 - Suhu *waterbath* 36-37°C.

3. Lekatkan pada obyek glass yang telah dicoating.
4. Simpan dalam incubator 38°C sehari semalam agar lebih kuat merekat. Sebelum proses pewarnaan keringkan dan panaskan di atas *hot plate* selama 1 jam.
5. Deparafinisasi dengan xylol I; II; III masing-masing 3 menit.
6. Masukkan dalam ethanol, alcohol 90; 80% masing-masing 2-3 menit.
7. Cuci dengan air mengalir 2-3 menit.
8. Masukkan dalam H₂O₂ dalam methanol 0.5% (100 ml + 1.6 ml H₂O₂) selama 20 menit.
9. Cuci dengan air mengalir 2-3 menit.
10. *Antigen Retrieval* rendam dalam larutan DIVA, panaskan dalam *Decloacking Chamber*.
11. Dinginkan dengan suhu ruangan 20-30 menit.
12. Rendam dengan PBS 2-5 menit.
13. Letakkan slide dalam moisture chamber dan beri pembatas pada sekeliling sediaan dengan PAP pen, teteskan Background Sniper 10-15 menit.
14. Teteskan antibodi primer, inkubasi 60 menit.
15. Cuci dengan PBS selama 3-5 menit.
16. Teteskan antibodi sekunder, inkubasi 10 menit.
17. Cuci dengan PBS selama 3-5 menit.
18. Teteskan TREKAVIDIN-HRP LABEL, inkubasi 10 menit.
19. Cuci dengan PBS 3-5 menit.
20. Teteskan dengan DAB inkubasi 2-4 menit (1 ml BETAZOID DAB SUBSTRATE BUFFER) tambah 1-2 tetes DAB chromogen.
21. Cuci dengan air mengalir 5-7 menit.

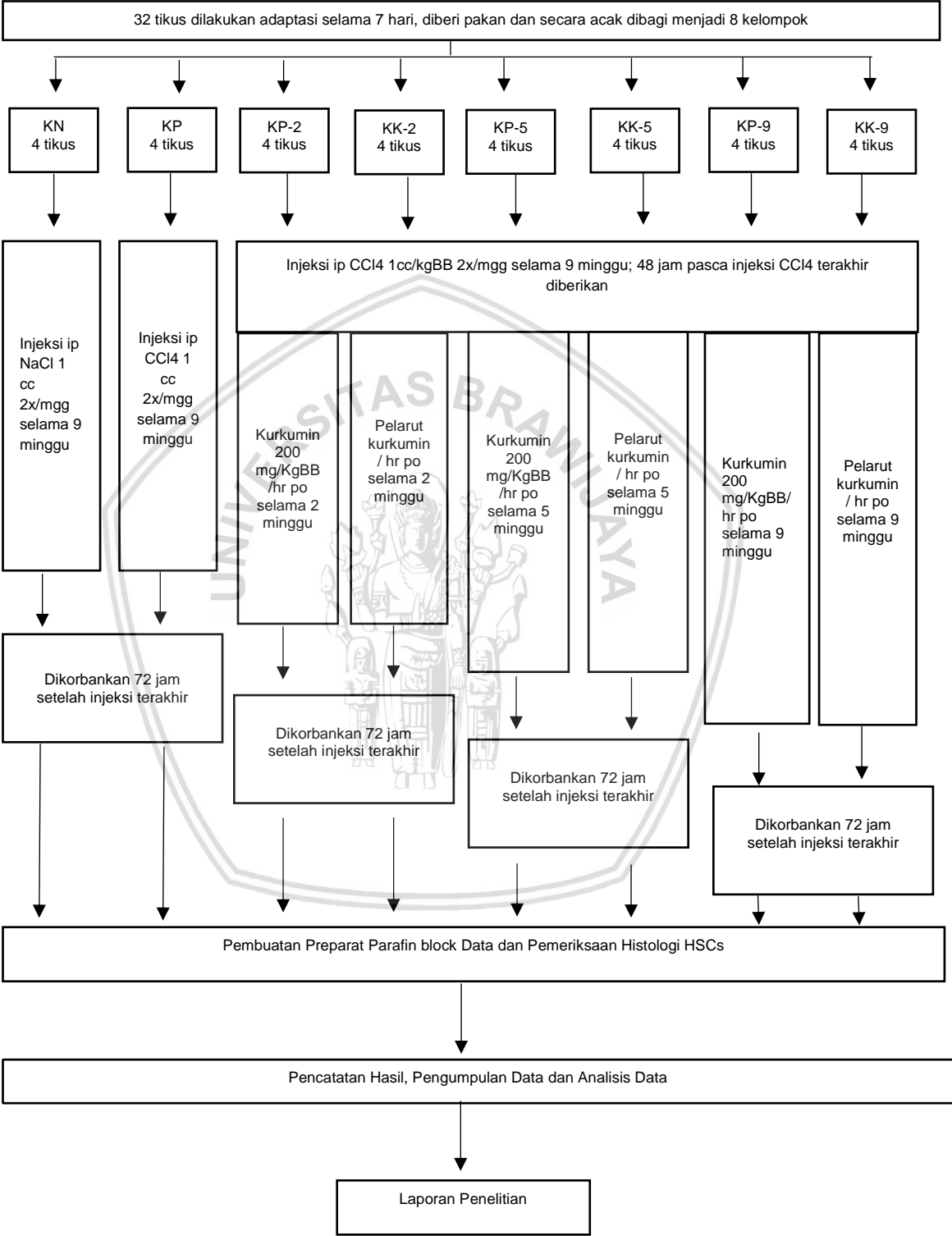
22. *Counterstain* dengan *mayers haematoxilin* 2-3 menit. Rendam dalam lithium karbonat jenuh 2-3 menit.

23. Cuci dengan air mengalir 5-7 menit.

24. Dehidrasi dengan alcohol 80%; 96%; alcohol absolut sampai dengan xylol I, II, III masing-masing 3 menit.



4.7.5. Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.2. Bagan Alur Penelitian

4.8. Uji Analisis Data

Data ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 jaringan hati diolah secara analitis dan deskriptif dengan menggunakan alat bantu software komputer SPSS 16.0. Analisis data yang dilakukan adalah uji asumsi data yaitu uji normalitas *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas data *Levene*. Jika uji asumsi data terpenuhi, yaitu sebaran data normal dan varian data homogeny ($p>0.05$), maka digunakan uji analisis statistika parametric. Pengujian pengaruh pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis dengan menggunakan 2 kelompok pemberian kurkumin (KK dan KP) dan 3 level lama pemberian kurkumin (2, 5, dan 9 minggu) dilakukan dengan menggunakan *Two way ANOVA*. Untuk mengetahui hubungan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson. Penelitian ini dianalisis dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$).



BAB V

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Juni 2016 sampai dengan November 2016.

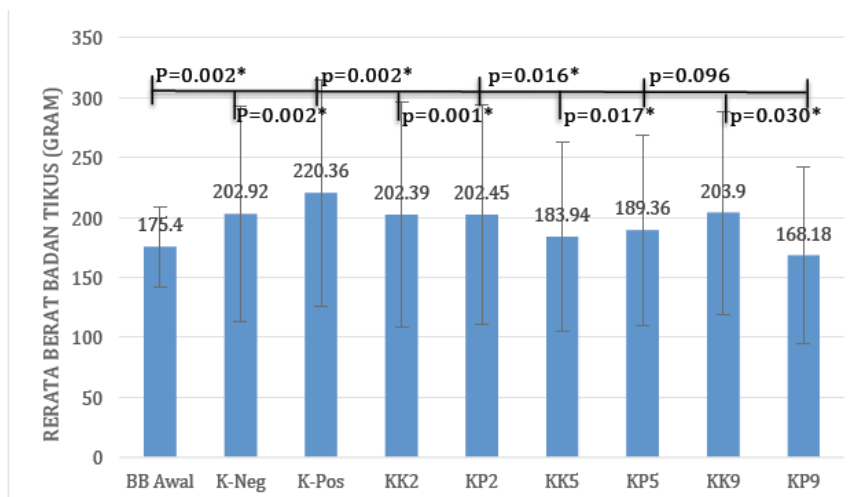
Penelitian ini menggunakan 32 ekor hewan coba tikus wistar yang dibagi dalam 8 kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Pada kelompok kontrol positif (KP) diberikan injeksi CCl₄ 1 cc/kgbb 2x seminggu selama 9 minggu dan dilanjutkan pemberian kurkumin 200 mg/kgbb peroral selama 2, 5, dan 9 minggu pada kelompok (KP2, KP5, dan KP9), pemberian pelarut kurkumin CMC Na 1% selama 2, 5 dan 9 minggu untuk kelompok (KK2, KK5, dan KK9). Pada kelompok kontrol negatif (KN) diberikan injeksi NaCl 0.9% 1 cc/kgbb 2x/minggu selama 9 minggu. Kemudian pengamatan dilakukan terhadap perkembangan berat badan tikus, ekspresi MMP-2, dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis.

5.1 Perkembangan Berat Badan sesuai Kelompok Perlakuan serta Derajat Fibrosis Hati

Data berat badan awal dan akhir tikus serta pengamatan terhadap fibrosis hati dari tim penelitian ini, didapatkan hasil sebagai berikut: ⁹³

Tabel 5.1. Berat Badan Tikus Sesuai Kelompok Perlakuan, Derajat Fibrosis Hati, Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2

Perlakuan	Tikus	Berat Badan Awal (gram)	Berat Badan Akhir (gram)	Derajat fibrosis hati	MMP-2 (Sel)	TIMP-2 (Sel)
K-Neg Diinjeksikan NaCl 1cc 2x/minggu selama 9 minggu	1	180	225	F0	4.75	1.75
	2	218	264	F0	4.5	2.00
	3	190	253	F0	4.6	1.60
	4	157	213	F1	4.8	1.80
K-Pos Diinjeksikan CCl ₄ 1cc 2x/minggu selama 9 minggu	1	179	213	F3	5.25	3.90
	2	207	287	F3	5.40	4.30
	3	170	243	F2	5.15	4.00
	4	193	286	F3	5.20	3.75
KP-2 Diberikan sonde kurkumin (200mg/kgBB) selama 2 minggu	1	188	247	F2	6.90	2.00
	2	168	212	F2	6.75	1.80
	3	168	245	F1	6.60	2.25
	4	202	253	F1	7.10	1.90
KK-2 Diberikan sonde pelarut kurkumin selama 2 minggu	1	178	224	F2	5.35	3.80
	2	188	240	F3	5.20	3.75
	3	191	250	F2	5.40	3.60
	4	183	248	F2	5.60	4.00
KP-5 Diberikan sonde kurkumin (200mg/kgBB) selama 5 minggu	1	174	189	F2	7.80	1.20
	2	198	277	F2	8.00	1.00
	3	175	214	F3	8.20	0.90
	4	164	197	F2	7.75	1.25
KK-5 Diberikan sonde pelarut kurkumin selama 5 minggu	1	173	208	F3	5.50	3.60
	2	169	184	F2	5.75	3.55
	3	180	208	F1	5.20	3.75
	4	193	258	F3	6.00	3.25
KP-9 Diberikan sonde kurkumin (200mg/kgBB) selama 9 minggu	1	174	219	F0	10.60	0.50
	2	173	206	F1	9.75	0.35
	3	169	195	F0	11.20	0.75
	4	153	171	F1	10.75	0.40
KK-9 Diberikan sonde pelarut kurkumin selama 9 minggu	1	216	325	F0	6.10	1.80
	2	169	176	F1	6.25	2.00
	3	186	217	F1	6.50	2.25
	4	184	209	F1	6.30	1.80



Gambar 5.1. Grafik Rerata Berat Badan Awal dan Akhir Tikus Sesuai Kelompok Perlakuan.

Dari penelitian, didapatkan rerata berat badan tikus pada awal penelitian sebesar 175.4 gram, sedangkan rerata berat badan tikus akhir tertinggi pada kelompok KP sebesar 220.36 gram. Didapatkan peningkatan berat badan yang signifikan pada tiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan berat badan awal. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa dengan pemberian CCl₄ 1cc/kgBB 2x perminggu selama 9 minggu, akan terbentuk fibrosis hati F3 (*septal fibrosis*) pada sebagian besar tikus pada kelompok Kontrol Positif. Hanya ada satu tikus yang terbentuk fibrosis F2 (*portal fibrosis with few septa*).⁹³

5.2 Hasil Pemeriksaan Histopatologi Ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada Tikus Model Fibrosis

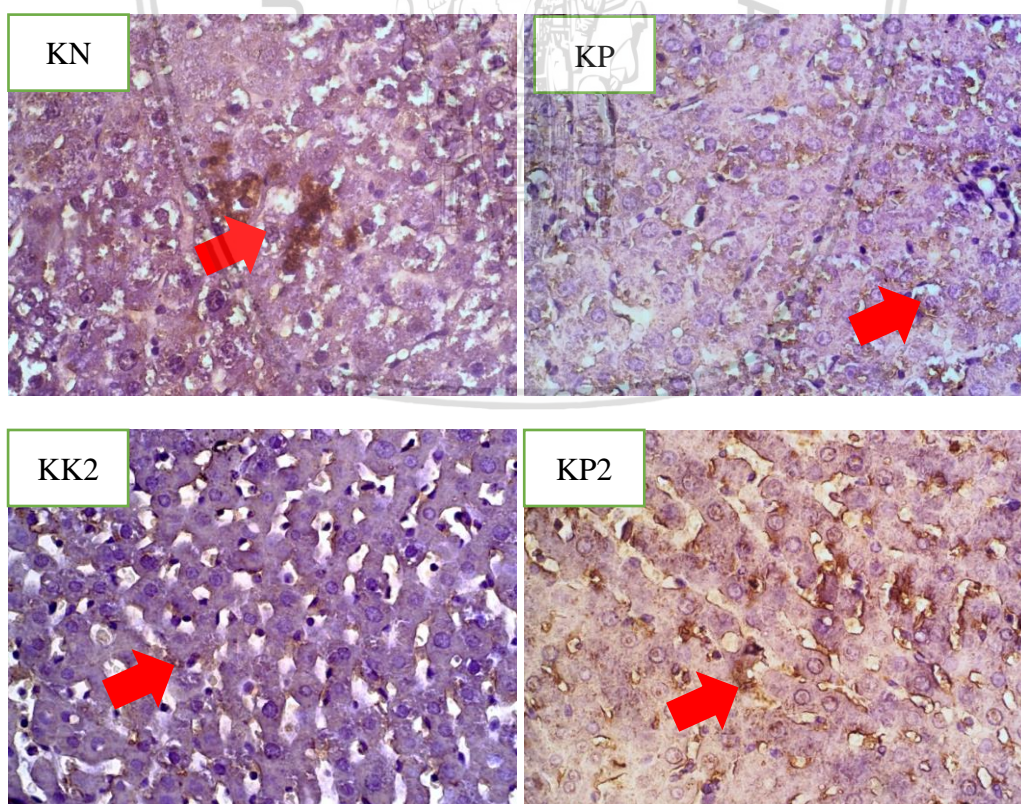
Pemeriksaan imunohistokimia ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 pada HSCs tikus model fibrosis. Data setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi, dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*). Skala semikuantitatif IRS

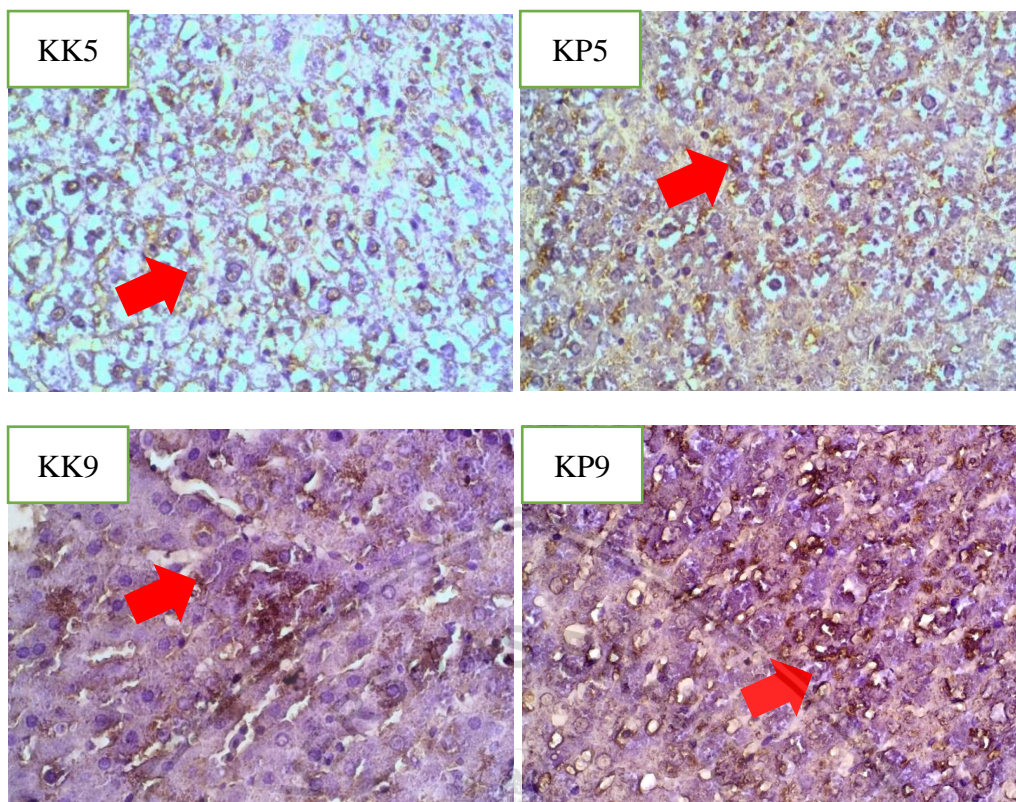
merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 10 (Sepuluh) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 100x dan 400x.⁹⁴

Tabel 5.2. Skala semikuantitatif IRS.⁹⁴

A	B
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80%	

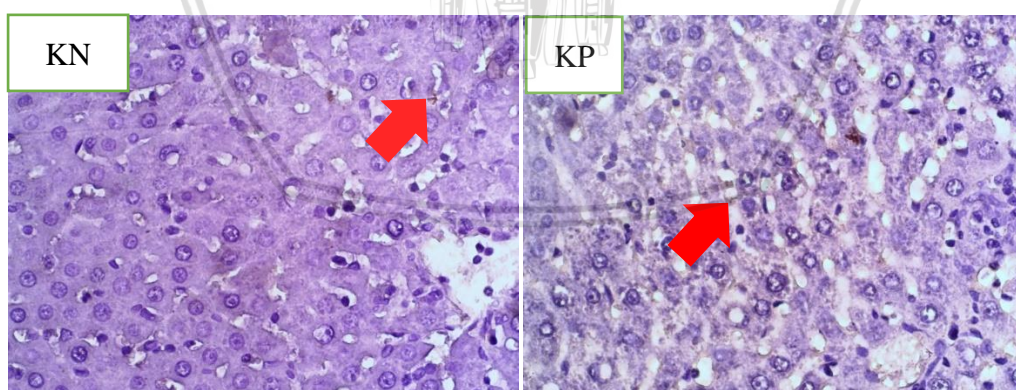
5.2.1 Pemeriksaan Histopatologi Ekspresi MMP-2 di HSCs.

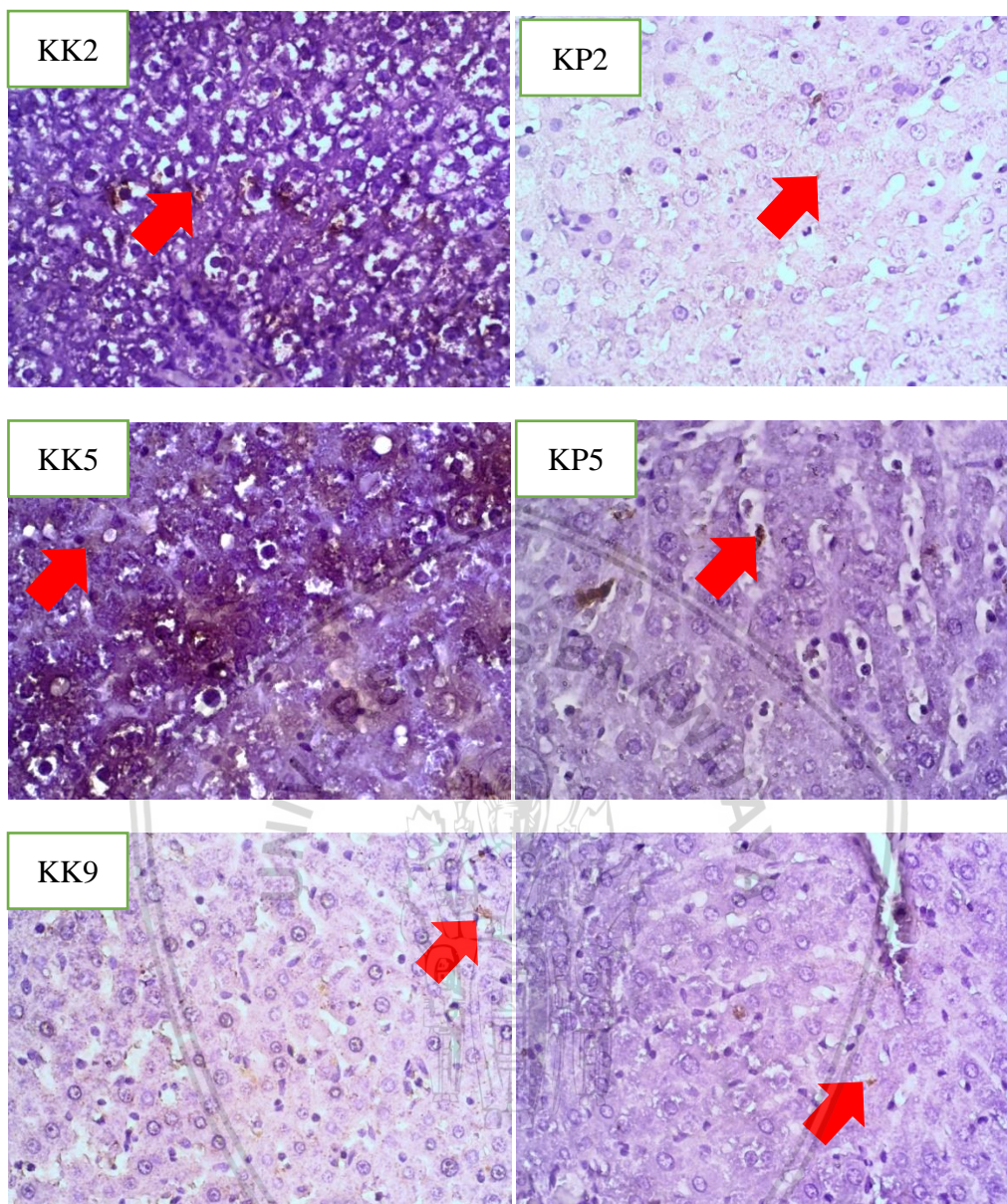




Gambar 5.2. Gambaran ekspresi MMP-2 pada HSCs. Tanda panah menunjukkan adanya ekspresi MMP-2 pada HSCs yang ditandai dengan adanya warna coklat chromogen (panah merah). IHC. 400x

5.2.2 Pemeriksaan Histopatologi Ekspresi TIMP-2 di HSCs.





Gambar 5.3. Gambaran ekspresi TIMP-2 pada HSCs. Tanda panah menunjukkan adanya ekspresi TIMP-2 pada HSCs yang ditandai dengan adanya warna coklat chromogen (panah merah). IHC. 400x

5.3 Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Pengujian pengaruh pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis dengan menggunakan 2 kelompok pemberian kurkumin (KK dan KP) dan 3 level lama pemberian kurkumin (2, 5, dan 9 minggu) dilakukan dengan menggunakan *Two way ANOVA*. Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA,

terlebih dahulu dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.3 Uji Asumsi Normalitas.

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Ekspresi MMP-2 di HSCs	0.858	0.083	Normal
Ekspresi TIMP-2 di HSCs	0.906	0.099	Normal

Berdasarkan pada tabel 5.3 di atas, pada variabel ekspresi MMP-2 di HSCs didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada variabel tersebut telah terpenuhi. Demikian juga pada variabel ekspresi TIMP-2 di HSCs didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi.

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam :

Tabel 5.4 Uji Asumsi Homogenitas Ragam.

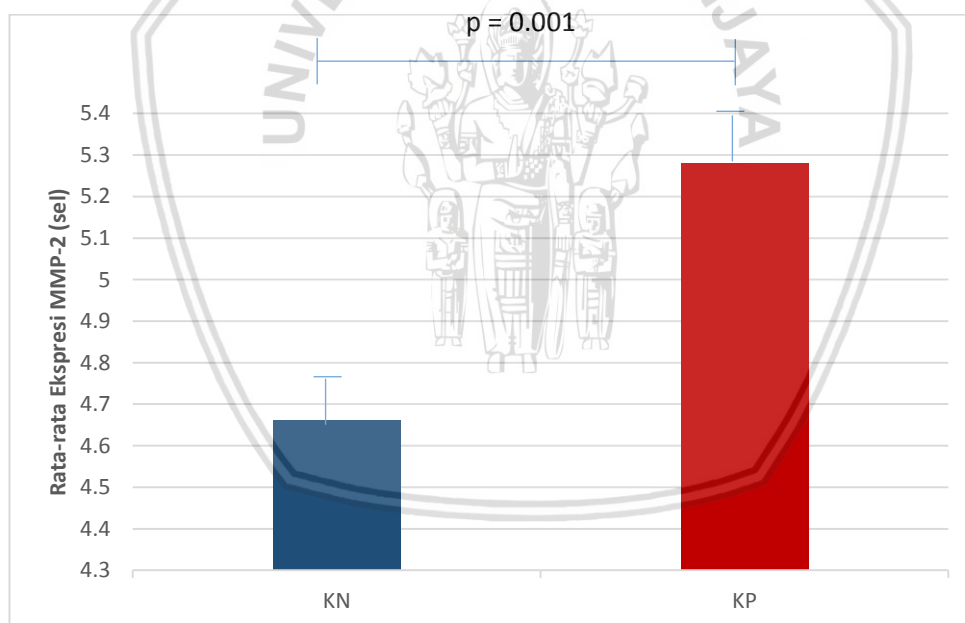
Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Ekspresi MMP-2 di HSCs	1.576	0.217	Homogen
Ekspresi TIMP-2 di HSCs	0.111	0.988	Homogen

Berdasarkan hasil uji asumsi homogenitas ragam pada tabel di atas, terlihat bahwa pada variabel ekspresi MMP-2 di HSCs didapatkan p-value lebih

dari 0.05 ($p > 0.05$). Demikian juga pada variabel ekspresi TIMP-2 di HSCs didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada kedua variabel tersebut telah terpenuhi.

5.4 Pengujian Ekspresi MMP-2 di HSCs pada Tikus Model Fibrosis.

Untuk menguji ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model Fibrosis, dapat dilakukan dengan menggunakan uji t independen, yakni membandingkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model Fibrosis (Kontrol Positif) dengan tikus dalam kondisi sehat (Kontrol Negatif). Secara deskriptif, ekspresi MMP-2 di HSCs pada kedua kelompok tersebut dijelaskan dalam gambar berikut :



Gambar 5.4. Histogram Rata-Rata Ekspresi MMP-2 di HSCs Tikus Model Fibrosis Hati

Berdasarkan Gambar 5.4, rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs pada kelompok Kontrol Negatif (KN) adalah sebesar 4.66 ± 0.14 sel dan pada kelompok Kontrol Positif (KP) sebesar 5.28 ± 0.10 sel. Secara deskriptif, terjadi peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis. Untuk mengetahui signifikansi

peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs secara statistik, dilakukan pengujian dengan menggunakan uji t. Berikut hasil perbandingan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis :

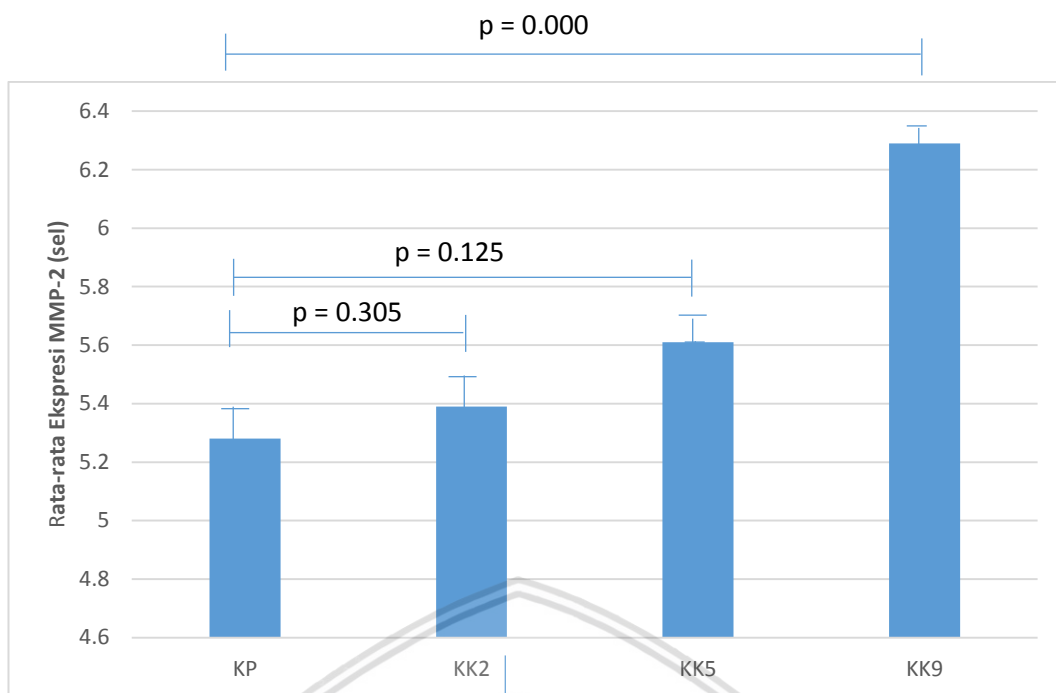
Tabel 5.5 Uji t Independen Kadar MMP-2 Tikus Model Fibrosis

Kelompok	Mean \pm SD	t-hitung	p-value
KN	4.66 \pm 0.14	-7.097	0.001
KP	5.28 \pm 0.10		

Berdasarkan Tabel 5.5, hasil uji t independen didapatkan nilai t-hitung sebesar -7.097 dengan p-value sebesar 0.001. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan kadar MMP-2 antara kelompok kontrol positif (KP) dengan kelompok kontrol negatif (KN). Dengan kata lain, terjadi peningkatan kadar MMP-2 pada tikus model fibrosis yang signifikan secara statistik.

5.5 Pengaruh Penghentian Paparan CCl₄ Terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs.

Untuk mengetahui pengaruh penghentian paparan CCl₄ terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs yang menandakan adanya proses resolusi spontan fibrosis hati, dapat dilakukan dengan membandingkan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin. Berikut hasil perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin :



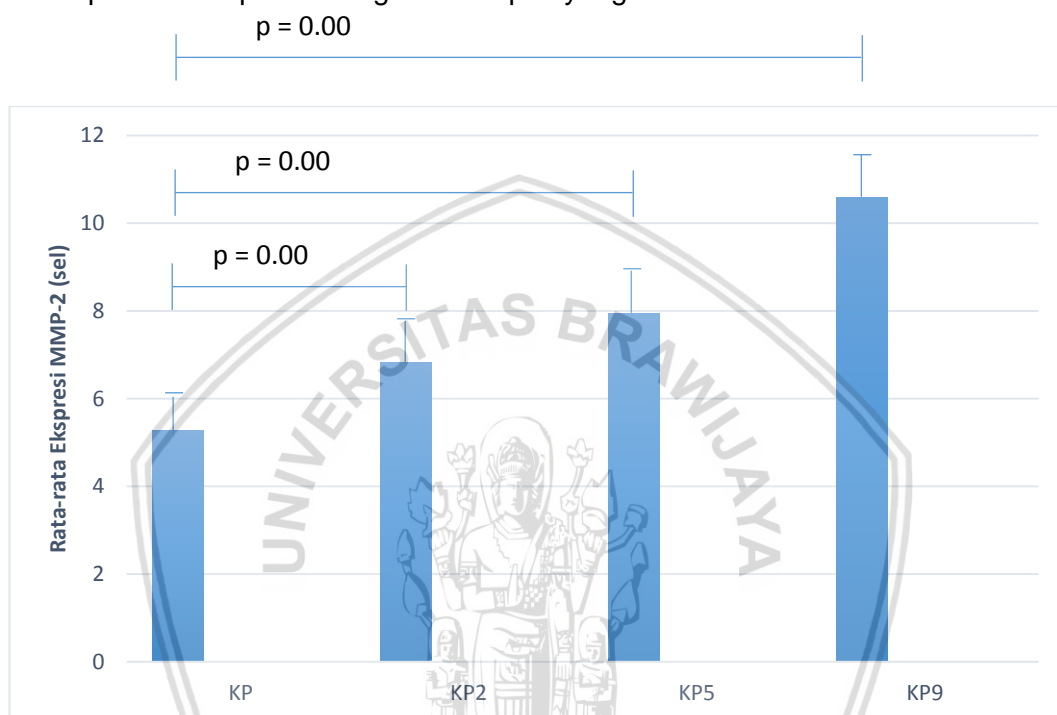
Gambar 5.5. Histogram Perbandingan Ekspresi MMP-2 di HSCs antara Kelompok Kontrol Positif dengan Kelompok yang Diberikan Pelarut Kurkumin

Pada Gambar 5.5 ditunjukkan histogram perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin. Sebagaimana terlihat dalam grafik tersebut, pada semua kelompok yang diberikan pelarut kurkumin (KK2, KK5, dan KK9) terjadi peningkatan rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs. Pada kelompok KK2 dan KK5, terjadi peningkatan rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs namun p-value lebih dari 0.05, yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs antara kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin yang diberikan selama 2 minggu dan 5 minggu.

Jika dibandingkan dengan KK9, didapatkan peningkatan rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs dengan p-value kurang dari 0.05. Dari pengujian ini terbukti bahwa terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs yang signifikan pada minggu ke 9.

5.6 Pengaruh Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs, dapat dilakukan dengan membandingkan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin. Berikut hasil perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin:



Gambar 5.6. Histogram Perbandingan Ekspresi MMP-2 di HSCs antara Kelompok Kontrol Positif dengan Kelompok yang Diberikan Kurkumin

Pada Gambar 5.6 ditunjukkan histogram perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin. Sebagaimana terlihat dalam grafik tersebut, pada semua kelompok pemberian kurkumin didapatkan p-value kurang dari 0.05, yang berarti terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs antara kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin selama 2, 5, dan 9 minggu. Hal ini membuktikan bahwa pemberian kurkumin selama 2, 5 dan 9 minggu terbukti mampu meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs secara signifikan.

5.7 Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs dengan Uji *Two Way ANOVA*.

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi MMP-2 di HSCs telah terpenuhi. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian kurkumin dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs dengan menggunakan uji ANOVA.

Tabel 5.6. Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Kadar MMP-2 dengan Uji *Two Way ANOVA*

Faktor	F-hitung	p-value
Kurkumin	414.505	0.000
Lama	109.151	0.000
Interaksi	40.391	0.000

Pengujian dengan menggunakan *two way ANOVA*, terdapat dua faktor utama dan satu faktor interaksi. Berdasarkan pada Tabel 5.6 di atas, ditunjukkan bahwa pada faktor kurkumin, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs. Pada faktor lama pemberian kurkumin, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa lama pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs.

Pada faktor interaksi, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara pemberian kurkumin dengan lama pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs.

Oleh karena itu, pengujian lanjutan (*post hoc test*) dengan menggunakan uji Tukey dilakukan pada faktor kurkumin, lama pemberian kurkumin dan interaksi antara pemberian kurkumin dengan lama pemberian kurkumin. Berikut hasil uji Tukey ketiga faktor tersebut :

Tabel 5.7. Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs.

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
Pelarut Kurkumin	5.76 \pm 0.45	0.000
Kurkumin	8.45 \pm 1.68	

Tabel 5.8 Pengujian Pengaruh Lama Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
2 minggu	6.11 \pm 0.79	0.000
5 minggu	6.77 \pm 1.26	
9 minggu	8.43 \pm 1.82	

Tabel 5.9 Pengujian Pengaruh Interaksi Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi MMP-2 di HSCs

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
KK2	5.39 \pm 0.17	a
KP2	6.84 \pm 0.21	b
KK5	5.61 \pm 0.34	a
KP5	7.94 \pm 0.21	c
KK9	6.29 \pm 0.17	ab
KP9	10.58 \pm 0.61	d

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA terhadap ketiga faktor tersebut di atas, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pemberian kurkumin, lama pemberian kurkumin serta interaksi pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi MMP-2 di HSCs.

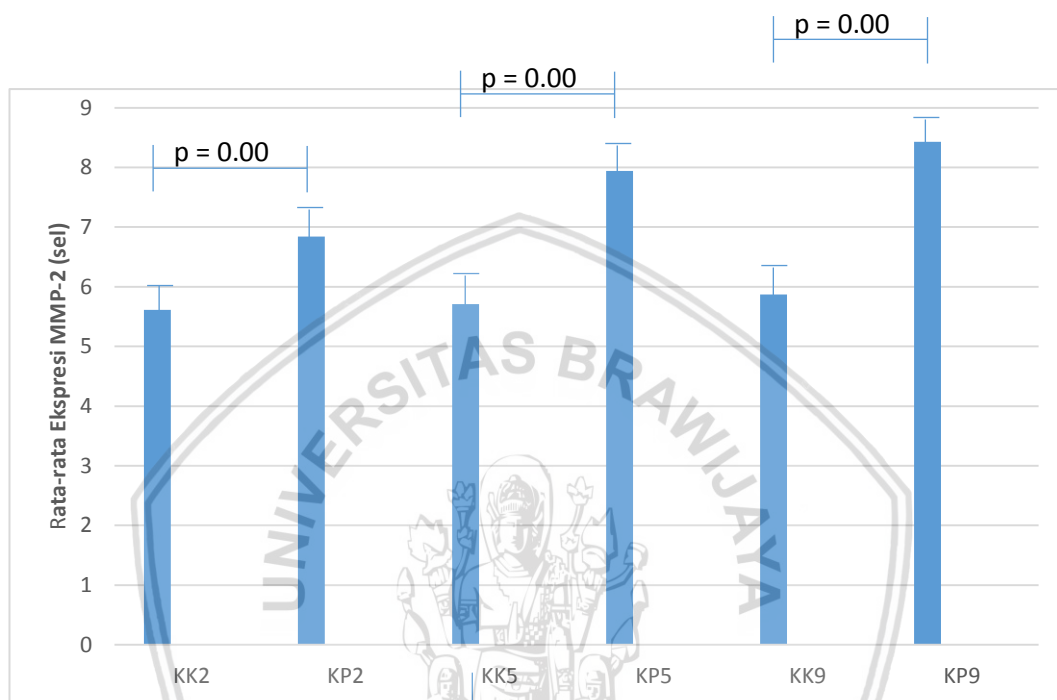
Berdasarkan hasil uji Tukey 5 % pada Tabel 5.9 di atas, pada perbandingan antara kelompok KK2 dengan KP2, terlihat bahwa terjadi peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP2) lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK2). Pada pengujian ini, terbukti bahwa pada minggu ke-2, pemberian kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Pada perbandingan antara kelompok KK5 dengan KP5, terjadi peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP5) lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK5). Pada pengujian ini, terbukti bahwa pada minggu ke-5, pemberian kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Pada perbandingan antara kelompok KK9 dengan KP9, terlihat bahwa terjadi peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP9) lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK9). Pada pengujian ini, terbukti bahwa pada minggu ke-9, pemberian

kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Rata-rata kadar MMP-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



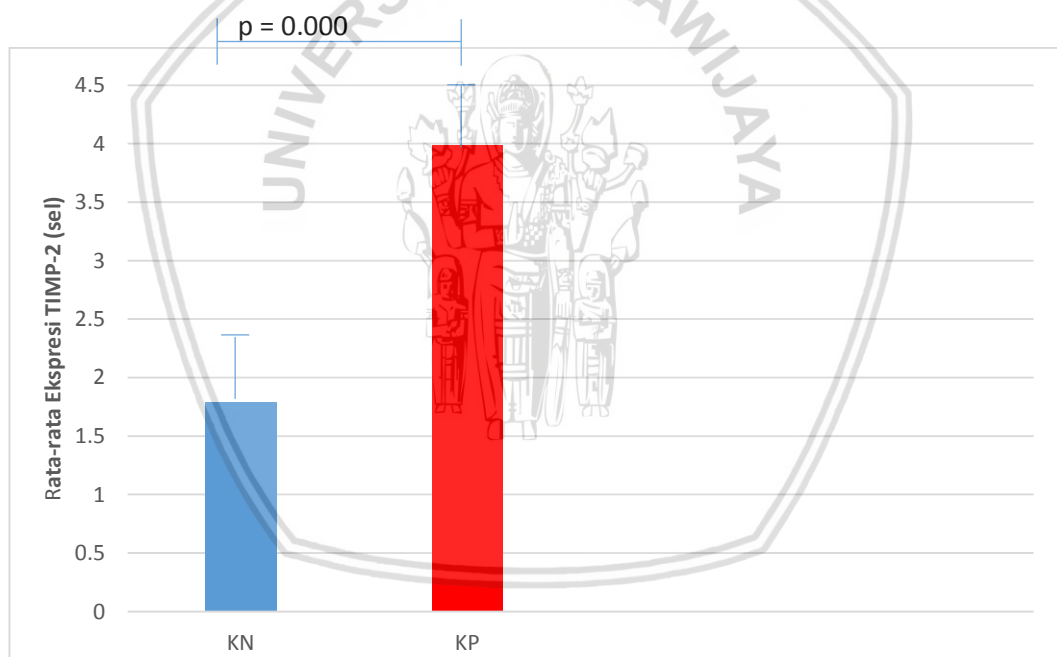
Gambar 5.7. Histogram Perbandingan Ekspresi MMP-2 di HSCs pada Berbagai Kelompok Perlakuan Berdasarkan Waktu

Pada Gambar 5.7 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs semua kelompok kontrol dan perlakuan pada tiap minggu waktu pemberian kurkumin. Pada kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs cenderung meningkat pada minggu ke-5 dan ke-9. Demikian juga pada kelompok perlakuan pemberian kurkumin, rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs cenderung meningkat pada minggu ke-5 dan ke-9. Jika dibandingkan berdasarkan lama pemberian kurkumin, terlihat bahwa pada waktu pengamatan 2 minggu, rata-rata ekspresi MMP-2 di HSCs pada kelompok kontrol (KK) lebih rendah daripada kelompok pemberian kurkumin (KP). Hal ini juga terjadi pada waktu pengamatan

5 minggu dan 9 minggu. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa pada pengamatan 2 minggu, 5 minggu dan 9 minggu terjadi peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs secara signifikan.

5.8 Pengujian Ekspresi TIMP-2 di HSCs pada Tikus Model Fibrosis.

Untuk menguji ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model Fibrosis, dapat dilakukan uji t independen, yakni membandingkan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model Fibrosis (Kontrol Positif) dengan tikus dalam kondisi sehat (Kontrol Negatif). Secara deskriptif, ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kedua kelompok tersebut dijelaskan dalam gambar berikut :



Gambar 5.8. Histogram Rata-Rata Ekspresi TIMP-2 di HSCs Model Fibrosis

Berdasarkan Gambar 5.8, ditunjukkan bahwa rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kelompok Kontrol Negatif (KN) sebesar 1.79 ± 0.17 sel dan pada kelompok Kontrol Positif (KP) sebesar 3.99 ± 0.23 sel. Secara deskriptif, terjadi peningkatan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis. Untuk mengetahui signifikansi penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs secara statistik,

dilakukan pengujian dengan menggunakan uji t. Berikut hasil perbandingan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis :

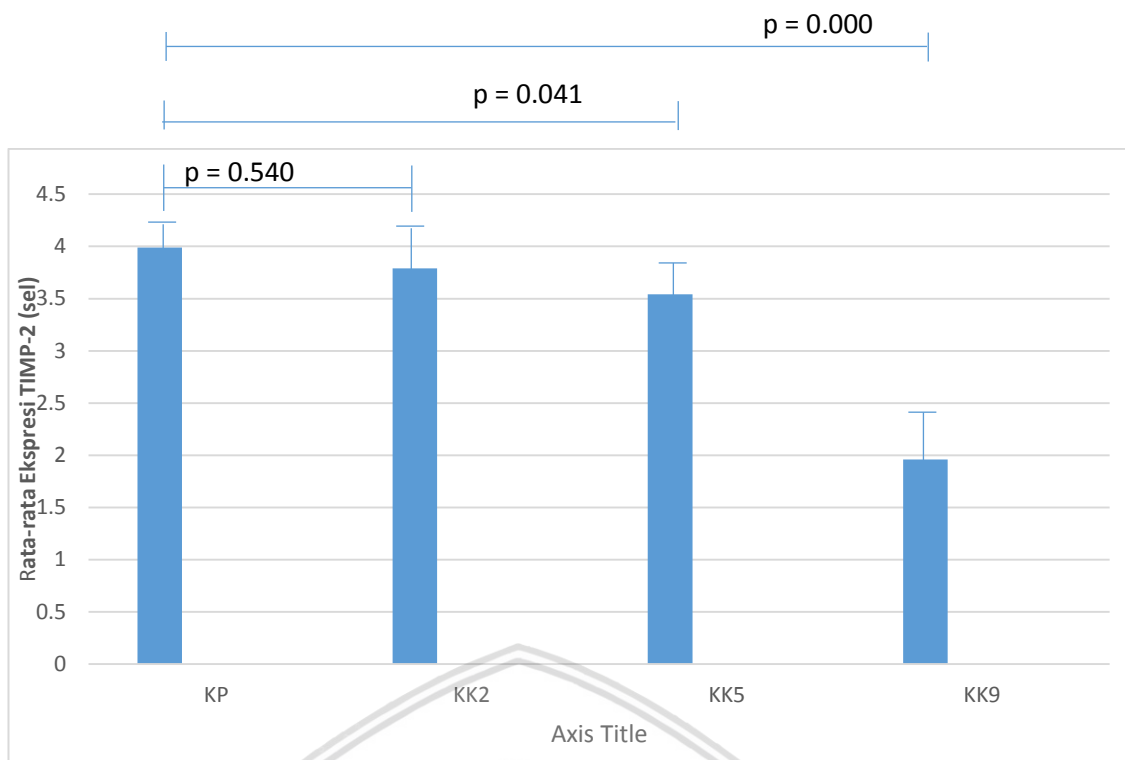
Tabel 5.10. Uji t Independen Ekspresi TIMP-2 di HSCs Tikus Model Fibrosis.

Kelompok	Mean \pm SD	t-hitung	p-value
KN	1.79 \pm 0.17	-15.436	0.000
KP	3.99 \pm 0.23		

Berdasarkan pada Tabel 5.10, hasil uji t independen didapatkan nilai t-hitung sebesar -15.436 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Atau dengan kata lain, terjadi penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs secara signifikan pada tikus model fibrosis.

5.9 Pengaruh Penghentian Paparan CCl₄ terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Untuk mengetahui pengaruh penghentian paparan CCl₄ terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs, dapat dilakukan dengan membandingkan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin. Berikut hasil perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin:



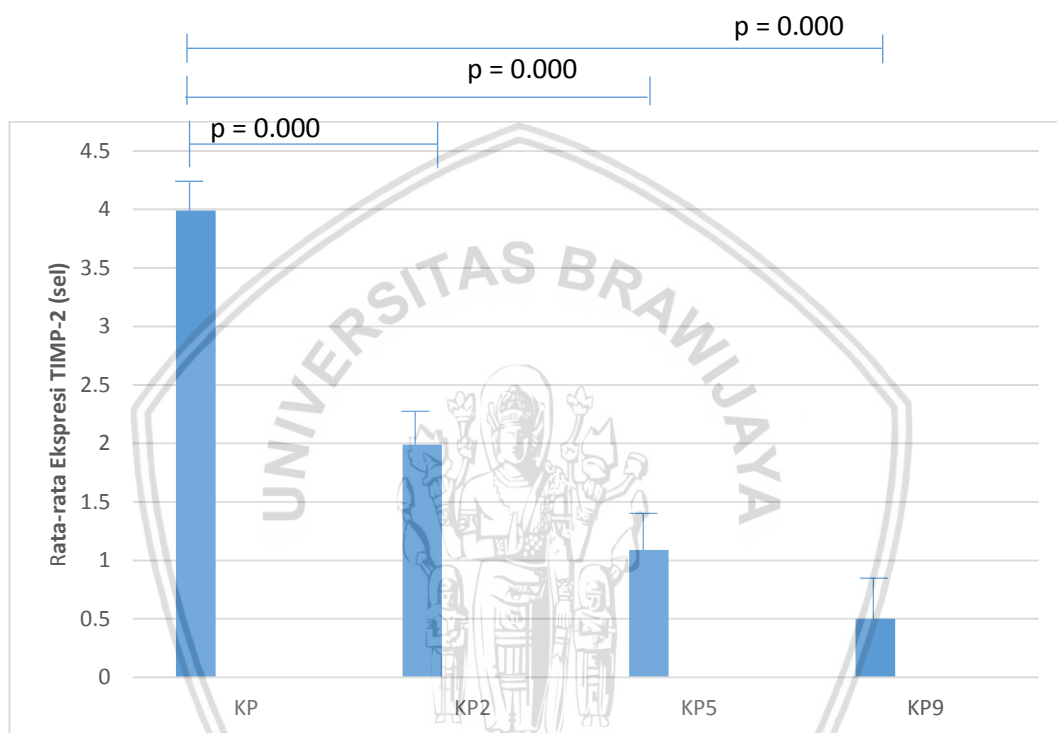
Gambar 5.9. Perbandingan Ekspresi TIMP-2 di HSCs antara Kelompok Kontrol Positif dengan Kelompok yang Diberikan Pelarut Kurkumin

Pada Gambar 5.9 ditunjukkan histogram perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin. Sebagaimana tampak dalam grafik tersebut, pada semua kelompok yang diberikan pelarut kurkumin (KK2, KK5, dan KK9) terjadi penurunan rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs. Pada kelompok KK2, terjadi penurunan rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs namun dengan p-value lebih dari 0.05, yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs antara kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan pelarut kurkumin yang diberikan selama 2 minggu.

Jika dibandingkan dengan KK5 dan KK9, terjadi penurunan rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs dengan p-value kurang dari 0.05. Dari pengujian ini terlihat penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs secara signifikan setelah penghentian paparan CCl₄ setelah 5 dan 9 minggu.

5.10 Pengaruh Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Untuk mengetahui pengaruh kurkumin terhadap ekspresi TIMP-2, di HSCs dapat dilakukan dengan membandingkan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin. Berikut hasil perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin :



Gambar 5.10. Perbandingan Ekspresi TIMP-2 di HSCs antara Kelompok Kontrol Positif dengan Kelompok yang Diberikan Kurkumin.

Pada Gambar 5.10 ditunjukkan histogram perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin. Sebagaimana terlihat dalam grafik tersebut, pada semua kelompok pemberian kurkumin didapatkan p-value kurang dari 0.05. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs antara kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberikan kurkumin selama 2, 5, dan 9 minggu. Hal ini

membuktikan bahwa pemberian kurkumin selama 2, 5 dan 9 minggu terbukti mampu menurunkan ekspresi TIMP-2 di HSCs secara signifikan.

5.11 Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs dengan Uji *Two Way ANOVA*.

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi TIMP-2 di HSCs telah terpenuhi. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian kurkumin dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs dengan menggunakan uji ANOVA.

Tabel 5.11 Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs dengan Uji *Two Way ANOVA*

Faktor	F-hitung	p-value
Kurkumin	612.46	0.000
Lama	159.26	0.000
Interaksi	14.19	0.000

Pengujian dengan menggunakan *two way ANOVA*, terdapat dua faktor utama dan satu faktor interaksi. Berdasarkan pada Tabel 5.11 di atas, ditunjukkan bahwa pada faktor kurkumin, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs. Demikian juga pada faktor lama pemberian kurkumin, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa lama pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Pada faktor interaksi, didapatkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara pemberian kurkumin dengan lama pemberian kurkumin berpengaruh signifikan terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa faktor interaksi Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin berpengaruh signifikan.

Tabel 5.12. Pengujian Pengaruh Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
Pelarut Kurkumin	3.10 \pm 0.86	0.000
Kurkumin	1.19 \pm 0.66	

Tabel 5.13. Pengujian Pengaruh Lama Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
2 minggu	2.88 \pm 0.98	0.000
5 minggu	2.31 \pm 1.32	
9 minggu	1.23 \pm 0.17	

Tabel 5.14. Pengujian Pengaruh Interaksi Pemberian Kurkumin dan Lama Pemberian Kurkumin Terhadap Ekspresi TIMP-2 di HSCs

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
KK2	3.79 \pm 0.17	a
KP2	1.99 \pm 0.19	b
KK5	3.54 \pm 0.21	a
KP5	1.09 \pm 0.17	c
KK9	1.96 \pm 0.21	d
KP9	0.5 \pm 0.18	b

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin terhadap ekspresi TIMP-2 di HSCs. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin dan lama pemberian kurkumin yang berbeda.

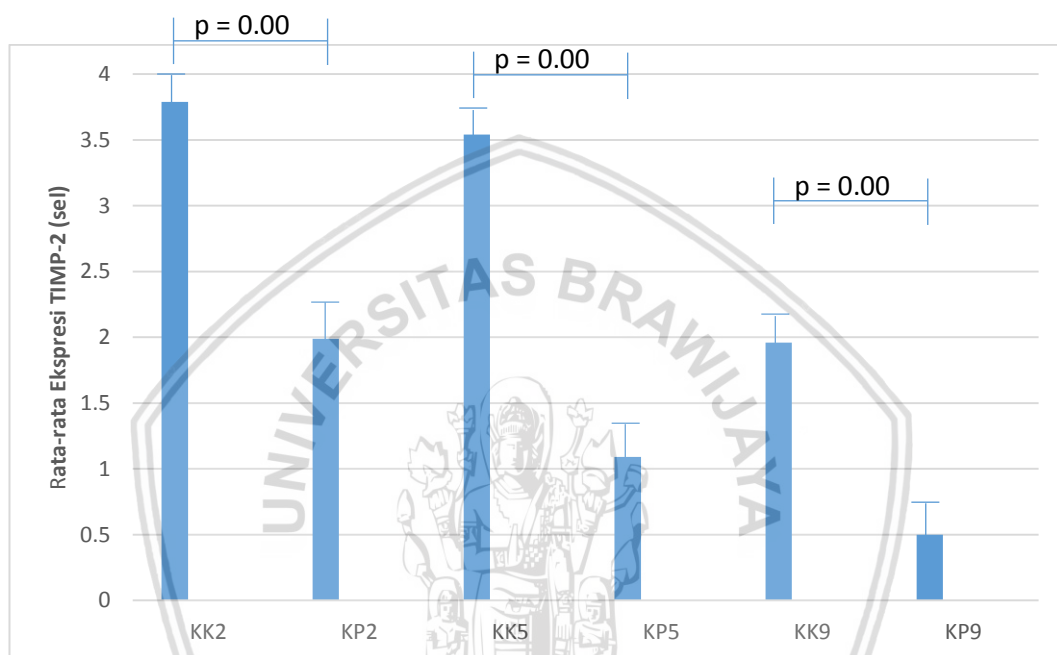
Berdasarkan pada hasil uji Tukey 5 % pada Tabel 5.14 di atas, pada perbandingan antara kelompok KK2 dengan KP2, terjadi penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP2) lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK2). Pengujian ini membuktikan bahwa pada minggu ke-2, pemberian kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Pada perbandingan antara kelompok KK5 dengan KP5, terjadi penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP5) lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK5). Pengujian ini membuktikan bahwa pada minggu ke-5, pemberian kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Pada perbandingan antara kelompok KK9 dengan KP9, terjadi penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs akibat pemberian kurkumin pada tikus model fibrosis. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan (KP9) lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol (KK9).

Pengujian ini membuktikan bahwa pada minggu ke-9, pemberian kurkumin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs tikus model fibrosis.

Rata-rata kadar TIMP-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.11. Histogram Perbandingan Ekspresi TIMP-2 di HSCs pada Berbagai Kelompok Perlakuan berdasarkan Waktu

Pada Gambar 5.11 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs semua kelompok kontrol dan perlakuan pada tiap minggu waktu pemberian kurkumin. Pada kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata ekspresi TIMP-2 cenderung menurun pada minggu ke-5 dan ke-9. Demikian juga pada kelompok perlakuan pemberian kurkumin, rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs cenderung menurun pada minggu ke-5 dan ke-9. Jika dibandingkan berdasarkan lama pemberian kurkumin, terlihat bahwa pada waktu pengamatan 2 minggu, rata-rata ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kelompok kontrol (KK) lebih tinggi daripada

kelompok pemberian kurkumin (KP). Hal ini juga terjadi pada waktu pengamatan 5 minggu dan 9 minggu. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa pada pengamatan 2 minggu, 5 minggu dan 9 minggu terjadi penurunan ekspresi MMP-2 di HSCs secara signifikan.

5.12 Pengujian Hubungan Antara Lama Pemberian Kurkumin dengan Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs dengan Uji Korelasi Pearson.

Untuk mengetahui hubungan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil uji korelasi sebagai berikut :

Tabel 5.15. Uji Hubungan Antara Lama Pemberian Kurkumin Dengan Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs

Hubungan	Korelasi	p-value
Lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs	0.951	0.000
Lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs	-0.962	0.000

Berdasarkan hasil pengujian korelasi antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.951 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs.

Pada hasil pengujian korelasi antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.962 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Fibrogenesis Hati yang Diinduksi CCl₄.

Penelitian ini menggunakan CCl₄ sebagai penginduksi terjadinya fibrosis hati. CCl₄ diberikan selama 9 minggu dengan tujuan membentuk *septal fibrosis* (F3). CCl₄ dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 untuk membentuk suatu radikal *trichloromethyl* reaktif (CCL3-) dan radikal *trichloromethyl peroxy* (CCl₃O₂). Kedua radikal tersebut berikatan dengan DNA, lemak, protein dan karbohidrat yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak, nekrosis sel, dan deposisi kolagen di hati. Sel Kupffer diaktivasi oleh radikal bebas dan memproduksi mediator proinflamasi, menyebabkan terpicunya kaskade inflamasi.⁹⁵

Dari penelitian sebelumnya, setelah pemberian injeksi CCl₄ intraperitoneal selama 9 minggu, dari hasil pemeriksaan pewarnaan Hematoxyllin-Eosin menunjukkan terbentuknya fibrosis F3 (*septal fibrosis*) pada kelompok KP dan hanya satu tikus yang terbentuk fibrosis F2. Sedangkan pada kelompok KN yang diberikan injeksi Normal Salin, terbentuk fibrosis F0 pada tiga tikus dan F1 pada satu tikus. Kemungkinan penyebab terjadinya hal tersebut adalah terjadi peningkatan berat badan tikus selama pemeliharaan sehingga terjadi *fatty liver disease*. Rata-rata berat badan akhir tikus pada kelompok KN sebesar 202.92 gram dan rata-rata kenaikan berat badan tikus sebesar 27.52 gram dibandingkan pada awal penelitian. Pada tikus yang terbentuk F1 kenaikan berat badannya sebesar 56 gram.⁹⁶ Kemungkinan yang lain dapat disebabkan oleh faktor genetik yaitu adanya polimorfisme pada gen yang mengkode berbagai faktor fibrogenesis seperti TGFβ, PDGF, CTGF, TNFα, TIMP-1.⁹⁷

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan berat badan yang signifikan pada tiap kelompok dibandingkan dengan berat badan pada awal penelitian. Namun kenaikan berat badan pada kelompok yang diberikan pelarut kurkumin lebih besar dibandingkan kelompok yang diberikan kurkumin. Salah satu mekanisme anti-inflamasi dari kurkumin adalah dengan meningkatkan aktivasi PPAR- γ , dimana PPAR- γ mempunyai efek menurunkan berat badan. PPAR- γ menurunkan berat badan melalui meningkatkan sensitivitas insulin dan menurunkan oksidasi lipid. Bagaimanapun juga, diperlukan analisa lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh aktivasi PPAR- γ oleh kurkumin dalam mempengaruhi berat badan tikus. Aktivasi PPAR- γ pada jaringan liver akan menghambat aktivasi HSCs melalui penurunan ekspresi TGF- β , menghambat signaling TGF- β 1/Smad, merangsang apoptosis HSCs, menghambat NF- κ B, memacu kerja MMP terutama MMP-2 dan MMP-9 untuk mendegradasi matriks ekstraseluler dengan hasil terjadinya penurunan proliferasi sel dan menekan terjadinya fibrosis hati.^{117,118}

6.2 Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs pada Tikus Model Fibrosis Hati.

Untuk mengetahui ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati yang diinduksi CCl₄, dilakukan pengamatan antara kelompok KN (tikus yang diinjeksi NaCl 0,9% intraperitoneal) yang diasumsikan sebagai tikus dengan kondisi sehat dengan kelompok KP (tikus yang diinjeksikan CCl₄ intraperitoneal 2x/minggu selama 9 minggu) sebagai tikus model fibrosis hati. Didapatkan peningkatan ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs yang nyata pada tikus model fibrosis hati dengan p-value sebesar 0.001 dan 0.000 ($p < 0.05$). Hal ini sesuai dengan penelitian dari Liang, et al, 2012, dimana

konsentrasi MMP-2 dan TIMP-2 serum meningkat signifikan pada kondisi fibrosis hati F2-F4.⁹⁸

6.3 Pengaruh Penghentian Paparan CCl₄ terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Fibrosis hati dapat disebabkan oleh berbagai macam penyebab, diantaranya akibat infeksi virus hepatitis B dan virus hepatitis C, autoimun atau metabolik serta paparan karbon tetraklorida. Dengan menghilangkan etiologi kerusakan hati, diharapkan dapat memperbaiki fibrosis hati.⁴²

Untuk mengetahui pengaruh penghentian paparan CCl₄ terhadap ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs, dilakukan analisis antara kelompok KP dengan Kelompok KK2, KK5, dan KK9. Peningkatan nyata ekspresi MMP-2 di HSCs maupun baru didapatkan antara kelompok KP dengan kelompok KK9. Penurunan nyata ekspresi TIMP-2 di HSCs didapatkan antara kelompok KP dengan kelompok KK5 dan KK9.

Fibrosis hati ditandai dengan proliferasi dan aktivasi dari HSC, yang bersifat myofibroblastik, dimana HSC merupakan sumber utama dari MMP-2 dan TIMP-2 yang merupakan regulator degradasi MES pada fibrosis hati.⁹⁹ Perjalanan HSC dan mekanisme degradasi matriks telah dipelajari pada reversibilitas fibrosis hati tikus model. Penelitian dari Minmoun, dkk, 2015, menunjukkan aHSC dengan cepat mengalami apoptosis setelah 4 minggu dari cedera hati akibat CCl₄, jika stimulus tersebut dihentikan. Dengan adanya apoptosis HSC, maka akan terjadi peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan TIMP-2.¹⁰⁰ Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini, dimana terjadi peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 di HSCS pada KK9 dan penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 di pada KK5 dan KK9.

Meski studi-studi terdahulu menyebutkan bahwa TIMP-2 bersifat menghambat MMP-2, ternyata diketahui kemudian bahwa up-regulasi TIMP-2 juga

dapat meningkatkan aktivasi MMP-2. Kedua aktivitas yang berlawanan ini sangat tergantung pada konsentrasi dari TIMP-2 itu sendiri. Disebutkan kadar TIMP-2 >800 ng/mL baru dapat memberikan efek inhibisi terhadap aktivitas MMP-2. Sedangkan konsentrasi yang lebih rendah justru dapat mengaktivasi MMP-2. Aktivasi dari MMP-2 membutuhkan kompleks aksi yang terdiri dari MT1-MMP, TIMP-2, dan pro MMP-2.¹⁰⁶

Pada penelitian Liang, et al 2012, menganalisa bahwa MMP-2 dan TIMP-2 tidak saling mempengaruhi. Hal ini dibuktikan pada penelitian, bahwa protein regulator MMP-2 (MT1-MMP dan TIMP-2) diproduksi dalam level yang sama baik pada tikus normal maupun tikus fibrosis yang diinduksi CCl₄ dengan deplesi MMP-2; karena TIMP-2 diproduksi secara independen oleh HSC tanpa dipengaruhi level MMP-2.¹⁰⁷

Dengan menghilangkan penyebab kerusakan hati, dimana dalam penelitian ini adalah CCl₄, maka akan dapat meningkatkan secara signifikan ekspresi MMP-2 di HSCs setelah 9 minggu paparan zat toksik dihentikan dan menurunkan secara signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs mulai 5 minggu setelah paparan zat toksik dihentikan. Hal ini kemungkinan terjadi karena pada 5 minggu kadar TIMP-2 belum cukup untuk terjadinya upregulasi terhadap kadar MMP-2 sehingga peningkatan signifikan MMP-2 baru terjadi pada minggu ke-9. Kemungkinan yang lain adalah TIMP-2 diproduksi secara independen oleh HSCs tanpa dipengaruhi MMP-2.

.6.4 Pengaruh Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Kurkumin memiliki peranan dalam memperbaiki kondisi kerusakan hati dan sirosis hati. Proses cedera hati yang disebabkan oleh virus, alkohol, dan berbagai toksin dapat menyebabkan progresifitas fibrosis hati dimana jaringan hati

yang normal digantikan oleh matriks ekstraselular yang kaya kolagen dan bila tidak ditangani akan menyebabkan terjadinya sirosis. *Hepatic stellate cells* (HSCs) berperan penting dalam perkembangan proses fibrosis. Setelah terjadinya kerusakan hati, HSC teraktivasi dan mengalami proliferasi, menghasilkan sitokin, kemokin, *growth factor*, dan sitokin profibrogenik dan inhibitor *metalloproteinase*.¹⁰¹

Banyak bukti menunjukan fibrosis hati bersifat *reversible*. Induksi apoptosis HSC berhubungan dengan reversibilitas fibrosis. Peran kurkumin pada fibrosis hati, antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antifibrosis dan efek antiproliferasi.¹⁰²

Kurkumin merupakan fitokimia alami yang banyak dipakai dalam pengobatan penyakit di bidang gastrointestinal. Kurkumin secara dramatis menekan proses peradangan dengan mengurangi kadar sitokin inflamasi, seperti *interferon-γ*, *tumor necrosis factor-α*, dan IL-17. Kurkumin juga meningkatkan kerja dari MMP-2, MMP-9 dan sekaligus menurunkan kerja dari TIMP-1 dan TIMP-2. Pemberian kurkumin dapat menghambat aktivasi sel stelate (HSCs) sehingga memperbaiki arsitektur hati yang mengalami fibrosis. Kurkumin sebagai anti fibrotik mempunyai beberapa titik tangkap, antara lain menghambat ROS, menurunkan ekspresi *TGF-β1*, menghambat signaling *TGF-β1/Smad*, merangsang apoptosis HSC, menghambat *NF-κB* sehingga mengurangi produksi matriks ekstraselular dan mengaktivasi *PPAR-γ*.^{29,30}

Pengaruh langsung kurkumin terhadap MMP-2 dan TIMP-2 pada fibrosis hati belum banyak dibahas di literatur. Penelitian *in vivo* lain juga memperlihatkan efek kurkumin dalam meningkatkan ekspresi gen MMP-2 pada proses fibrosis hati.²⁶ Pemberian kurkumin juga menunjukkan penurunan ekspresi TIMP-2 pada tikus model fibrosis hati.⁷⁸ Kurkumin menghambat aktivasi protein Ras (suatu protein yang mengatur proliferasi sel) sehingga akan meningkatkan ekspresi

MMP-2 dan menghambat ekspresi TIMP-2 yang selanjutnya akan menghambat jalur *PI3/Akt* dan terjadi hambatan terhadap pelepasan *Bcl-xl* dan sekaligus mengaktivasi pelepasan *Bax* sehingga terjadi apoptosis *aHSC*.²⁸⁻³⁰

Penelitian Duval et al tahun 2014 menyebutkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen activator inhibitor*) sehingga aktivitas Plasmin dalam menginduksi aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 tetap berlangsung.¹²¹

Penelitian Duval et al tahun 2014 menyebutkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati melalui hambatan terhadap PAI (*Plasminogen activator inhibitor*) sehingga aktivitas Plasmin dalam menginduksi aktivasi Pro MMP-2 menjadi MMP-2 tetap berlangsung.¹²¹

Pada penelitian Zhao et al tahun 2014 dijelaskan bahwa TIMP-2 dapat mengaktivasi ekspresi gen ERK 1/2 dan HIF-1 α dimana kedua gen tersebut bersifat antiapoptosis terhadap HSCs pada tikus model fibrosis hati. Peran kurkumin pada penelitian tersebut adalah aktivitasnya dalam menghambat ERK 1/2 (Extracellular regulated kinase 1/2) dan HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) sehingga menginduksi terjadinya apoptosis HSCs.¹²²

Dengan demikian, pemberian kurkumin diharapkan dapat memperbaiki proses fibrogenesis hati, yang ditandai dengan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati.

Dari hasil penelitian didapatkan hasil peningkatan nyata ekspresi MMP-2 dan penurunan nyata ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kelompok KP2, KP5, dan KP9 dibandingkan dengan kelompok KP. Hal ini menunjukkan kurkumin mampu meningkatkan MMP-2 dan menurunkan TIMP-2 yang mencerminkan penurunan derajat fibrosis hati.

6.5 Efek Pemberian Kurkumin Dibandingkan dengan Kelompok Plasebo (Pelarut Kurkumin).

Kurkumin aman dan efektif digunakan sebagai pengobatan dan pencegahan berbagai penyakit. Akan tetapi, data menunjukkan bahwa kurkumin memiliki bioavailabilitas yang buruk bila dicampur dengan air. Pada suatu penelitian menunjukkan dengan pemberian kurkumin pada dosis 2 g/kg pada tikus, mencapai serum konsentrasi $1.35 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ pada saat 0.83 jam, sedangkan pada manusia dengan pemberian dosis yang sama, kadar kurkumin tidak terdeteksi dan terlihat sangat rendah ($0.006 \pm 0.005 \mu\text{g/mL}$ pada jam pertama pengamatan).¹⁰³

Namun, saat ini nanoemulsi merupakan zat yang dapat meningkatkan bioavailabilitas kurkumin. Setelah dicampur dengan nanoemulsi, kadar kurkumin ditemukan lebih tinggi dibandingkan dengan suspensi kurkumin saja. *Carboxymethyl cellulose* (CMC) digunakan sebagai emulsifier kurkumin disebabkan karena turmeric berasal dari komponen *polyphenolic* yang tidak larut dalam air.¹⁰⁴

Kurkumin bekerja tergantung pada dosis dan waktu pemberian. Penelitian Lee et al menunjukkan bahwa dosis terapi kurkumin sebagai antifibrotik akibat induksi CCl₄ adalah 200-300 mg/kgBB per oral.¹⁰⁵ Pada penelitian ini dosis kurkumin yang digunakan adalah 200 mg/kgBB per oral.

Dari penelitian ini didapatkan peningkatan signifikan ekspresi MMP-2 di HSCs pada kelompok yang diberikan kurkumin selama 2 minggu (KP2) dibanding kelompok yang diberi pelarut kurkumin selama 2 minggu (KK2) dengan $p=0.000$ ($p<0.05$), begitu pula pada kelompok yang diberikan kurkumin selama 5 dan 9 minggu (KP5 dan KP9) dibanding kelompok yang diberi pelarut kurkumin selama 5 dan 9 minggu (KK5 dan KK9). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin

meningkatkan ekspresi MMP-2 di HSCs baik pada pemberian selama 2 minggu, 5 minggu maupun 9 minggu.

Dari penelitian ini didapatkan penurunan signifikan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada kelompok yang diberikan kurkumin selama 2 minggu (KP2) dibanding kelompok yang diberi pelarut kurkumin selama 2 minggu (KK2) dengan $p=0.000$ ($p<0.05$), begitu pula pada kelompok yang diberikan kurkumin selama 5 dan 9 minggu (KP5 dan KP9) dibanding kelompok yang diberi pelarut kurkumin selama 5 dan 9 minggu (KK5 dan KK9). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin menurunkan ekspresi TIMP-2 di HSCs baik pada pemberian selama 2 minggu, 5 minggu maupun 9 minggu.

6.6 Korelasi Lama Pemberian Kurkumin terhadap Ekspresi MMP-2 dan Ekspresi TIMP-2 di HSCs.

Dari hasil uji korelasi antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.951 dengan p-value sebesar 0.000 ($p<0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs. Koefisien korelasi bernilai 0.951 mengindikasikan adanya hubungan yang kuat antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi MMP-2 di HSCs. Koefisien korelasi bernilai positif mengandung pengertian bahwa dengan peningkatan durasi pemberian kurkumin, maka ekspresi MMP-2 akan semakin meningkat.

Pada hasil uji korelasi antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.962 dengan p-value sebesar 0.000 ($p<0.05$), menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs. Koefisien korelasi bernilai -0.962 mengindikasikan adanya hubungan yang kuat antara lama pemberian kurkumin dengan ekspresi TIMP-2 di HSCs. Koefisien korelasi bernilai

negatif mengandung pengertian bahwa dengan peningkatan durasi pemberian kurkumin, maka ekspresi TIMP-2 di HSCs akan semakin menurun.

Kurkumin bekerja tergantung pada dosis dan waktu pemberian. Penelitian Shu et al menunjukkan bahwa semakin lama pemberian kurkumin dan semakin tinggi konsentrasi kurkumin, efek pro apoptosis kurkumin terhadap HSCs semakin besar, dengan waktu optimum 48 jam dan dosis optimum 60 $\mu\text{M/L}$.¹¹⁹

Dari suatu penelitian yang mengamati toksisitas akut dan subkronik kurkumin menunjukkan dosis LD50 kurkumin pada tikus bila diberikan lebih dari 2000 mg/kgbb. Sedangkan pada toksisitas subkronik, diberikan kurkumin pada beberapa kelompok penelitian, yaitu diberikan kurkumin 180,360, dan 720 mg/kgbb/hari selama 90 hari, tidak didapatkan adanya toksisitas yang signifikan terhadap beberapa organ seperti hati, ginjal, jantung, dan limpa. Hal ini tersebut menunjukkan pemberian kurkumin 200 mg/kgbb/hari pada penelitian ini tidak menimbulkan terjadinya toksisitas subkronis pada hati, akan tetapi efektivitas kurkumin tampak bila diberikan dalam waktu 2 minggu.¹²⁰

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui efek pemberian kurkumin dan lama pemberiannya terhadap ekspresi MMP-2 dan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati yang diinduksi CCl₄, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 dan TIMP-2 di HSCs pada fibrosis hati.
2. Pada resolusi spontan fibrosis hati terdapat peningkatan ekspresi MMP-2 di HSCs setelah 9 minggu dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs setelah 5 minggu. Sedangkan pada resolusi akibat induksi kurkumin pada fibrosis hati terjadi peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs sejak pemberian minggu ke-2.
3. Terdapat perbedaan signifikan peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs antara kelompok yang diberikan dengan yang tanpa diberikan kurkumin, baik pada pemberian kurkumin selama 2 minggu, 5 minggu maupun 9 minggu pada fibrosis hati.
4. Lama pemberian kurkumin berkorelasi pada peningkatan ekspresi MMP-2 dan penurunan ekspresi TIMP-2 di HSCs pada tikus model fibrosis hati.

7.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diberikan beberapa saran antara lain:

1. Perlunya penelitian lanjutan untuk memahami mekanisme terjadinya upregulasi TIMP-2 terhadap MMP-2 saat terjadi fibrosis hati. Upregulasi ini

tergantung dari konsentrasi TIMP-2. TIMP-2 >800 ng/mL dapat memberikan efek inhibisi terhadap aktivitas MMP-2. Sedangkan konsentrasi yang lebih rendah justru dapat mengaktivasi MMP-2.

2. Perlunya penelitian lanjutan tentang peran MMP-2 dalam produksi TIMP-2 saat terjadi fibrosis hati karena beberapa penelitian menyebutkan bahwa protein regulator MMP-2 (MT1-MMP dan TIMP-2) diproduksi dalam level yang sama baik pada tikus normal maupun tikus fibrosis yang diinduksi CCl₄ dengan deplesi MMP-2.
3. Perlunya dilakukan pemeriksaan ekspresi MT1-MMP untuk lebih memahami mekanisme kerja kurkumin dalam meningkatkan MMP-2 dan menurunkan TIMP-2. Ikatan MT1-MMP pada N terminal TIMP-2 menghambat aktivitas MMP-2; sedangkan ikatan C terminal TIMP-2 dengan MT1-MMP akan meningkatkan aktivitas MMP-2.
4. Perlunya dilakukan pemeriksaan ekspresi PPAR γ untuk lebih memahami mekanisme kerja kurkumin dalam meningkatkan MMP-2. Kurkumin meningkatkan aktivitas PPAR γ dimana PPAR γ pada konsentrasi tertentu bersifat meningkatkan ekspresi MMP-2 dan kemudian menginduksi gen Bcl-xl yakni suatu gen pro apoptosis HSCs.
5. Perlunya dilakukan penelitian efek kurkumin berdasarkan perbedaan dosis terhadap ekspresi MMP-2 dan TIMP-2. Pada beberapa penelitian dosis kurkumin sebagai antifibrotik adalah 200-300 mg/KgBB per oral. Dosis <100 mg/KgBB per oral ternyata menyebabkan efek antiapoptosis HSCs. Sementara dosis 100- <200 mg/KgBB belum banyak diteliti.